Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

BEEINFLUSSUNG DER HEPATOTOXIZITÄT CHRONISCH TETRACHLORKOHLENSTOFF–VERGIFTETER RATTEN DURCH (+) -CATECHIN

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der

MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

JOSEF ZENTNER
aus Uttenweiler

1979

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

BEEINFLUSSUNG DER HEPATOTOXIZITÄT CHRONISCH TETRACHLORKOHLENSTOFF–VERGIFTETER RATTEN DURCH (+) -CATECHIN

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der

MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

(Theoretische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

JOSEF ZENTNER

aus Uttenweiler

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. med. H. Haselmann
1. Berichterstatter:	Dozent Dr. rer. nat. H. Kappus
	(Professor Dr. med. H. Remmer)
2. Berichterstatter:	Professor Dr, med. W. Dölle

Gedruckt bei H.- J. Köhler, Reprografischer Betrieb, 7400 Tübingen, Neue Str.11

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Kappus am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen angefertigt (Direktor: Prof. Dr. H. Remmer).

Herrn Prof. Dr. H. Remmer danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für sein Interesse an der Arbeit und seine wertvollen Anregungen.

Besonders danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Kappus für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Experimente.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. H. Haselmann, Institut für wissenschaftliche Mikroskopie, für die Anfertigung der Mikrophotographien, Herrn Prof. Dr. U. Schmidt, Institut für Pathologie, für die Durchsicht des histologischen Teils der Arbeit, Frl. Heni für die Herstellung der histologischen Schnitte und Frl. Mundle für die Anfertigung der Abbildungen zum histologischen Abschnitt.

Abkürzungen:

ADP	= Adenosin-5'-diphosphorsäure
Catechin	= (+)-Catechin = (+)-Cyanidanol-3
CCl_4	= Tetrachlorkohlenstoff
CO	= Kohlenmonoxid
EDTA	= Äthylendiaminotetraessigsäure
HE	= Hämatoxilin-Eosin
IDH	= Isocitratdehydrogenase
KCN	= Kaliumcyanid
MDA	= Malondialdehyd
$NADH_2$	= Nicotinamidadenindinucleotid reduziert
NADP	= Nicotinadenindinucleotidphosphat oxidiert
$NADPH_2$	= Nicotinadenindinucleotidphosphat reduziert
Na_2CO_3	= Natriumcarbonat
Na_2HPO_4	= Dinatriumhydrogenphosphat
NaH_2PO_4	= Natriumdihydrogenphosphat
PAS	= periodic-acid-Schiff-reaction (Periodsäure-Schiff-Reaktion)
TBA	= Thiobarbitursäure
Tris	= Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Inhaltsverzeichnis:

		Seite
1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Material	19
2.1.1.	Chemikalien	19
2.1.2.	Puffer-Lösungen und Reagenzien	21
2.1.3.	Geräte	22
2.2.	Methoden	22
2.2.1.	Präparation der Lebermikrosomen	22
2.2.2.	Bestimmung des mikrosomalen Proteins	23
2.2.3.	Bestimmung der Cytochrome P-450 und b-5 ...	24
2.2.4.	Bestimmung der NADPH-abhängigen Cytochrom c Reduktase	27
2.2.5.	Bestimmung der o-Demethylierung von p-Nitro-Anisol	28
2.2.6.	Bestimmung der p-Hydroxylierung von Anilin	29
2.2.7.	Bestimmung der Lipidperoxidation	30
2.2.8.	Methoden zur histologischen Untersuchung ..	32
2.2.8.1.	Fixierung der histologischen Präparate	32
2.2.8.2.	Nachbehandlung der fixierten Präparate: Auswaschen und Entwässern	32
2.2.8.3.	Einbettung in Paraffin	33
2.2.8.4.	Schneiden der in Paraffin eingebetteten Präparate	34
2.2.8.5.	Aufkleben der Schnitte	34
2.2.8.6.	Weiterbehandlung der aufgeklebten Schnitte	34
2.2.8.7.	Färbung der Schnitte	35
2.2.8.8.	Mikrophotographie der Schnitte und Herstellung von Schwarz-Weiß-Positiven	35
2.2.9.	Versuchstiere und Tierhaltung	36
2.2.10.	Fehlerberechnung	37
3.	Ergebnisse	38
3.1.	Gewichtsverlauf der Tiere	38
3.2.	Lipidperoxidation	41

Seite

3.3. Cytochrom P-450 44
3.4. Cytochrom b-5 47
3.5. NADPH-Cytochrom c Reduktase 51
3.6. P-Hydroxylierung von Anilin 54
3.7. O-Demethylierung von p-Nitro-Anisol 57
3.8. Ergebnisse der histologischen Untersuchung 61

4. Diskussion 89

5. Zusammenfassung 101

6. Literaturverzeichnis 104

1. Einleitung und Fragestellung

Unter den halogenierten Kohlenwasserstoffen kommt dem Tetrachlorkohlenstoff besondere Bedeutung zu, einerseits wegen seiner vielseitigen industriellen Verwendbarkeit, andererseits aufgrund seiner chemischen Eigenschaften, die ihn zum viel zitierten Modell submikroskopischer zellularbiologischer Betrachtungen in der pharmakologischen, toxikologischen und pathologischen Forschung werden ließen.

Bald nach seiner Einführung als Anästheticum durch Nunelly im Jahre 1849 wurde die außerordentliche Toxizität des Tetrachlorkohlenstoffs erkannt, die alle wesentlichen Systeme des menschlichen und - ungeachtet zahlreicher Speziesdifferenzen - auch des höheren tierischen Organismus betrifft, in erster Linie das hepatorenale System, das gesamte Nervensystem und nicht zuletzt auch das kardiovaskuläre System.

Trotz wohlbekannter Toxizität findet der Tetrachlorkohlenstoff vielseitige Verwendung, in der Industrie als Lösungsmittel für Öle und Fette, bei der Herstellung von Farben, Lacken und Textilien, ferner in der Quarzkristallindustrie und schließlich bei der Herstellung von Freon. Bis vor kurzem wurde er auch als Feuerlöschmittel und Insektizid, in der Humanmedizin früher, in der Tiermedizin teilweise auch heute noch als Anthelminthicum eingesetzt.

Erste Berichte über akut während therapeutischer Versuche aufgetretene Leberschädigungen durch Tetrachlorkohlenstoff gehen auf HALL (1922) und HALL und SCHILLINGER (1923) zurück. CAMERON und KARUNARATNE (1936), STOWELL und LEE (1950) und LEDUC und WILSON (1958) gaben detaillierte Darstellungen struktureller Leberveränderungen nach Tetrachlorkohlenstoff-Intoxikation. Umfassende ultrastrukturelle Untersuchungen der durch Tetrachlorkohlenstoff induzierten Leberzellschädigung verdanken wir OBERLING und ROUILLER (1956), BASSI (1960), MÖLBERT (1957), SMUCKLER, ISERI und BENDITT (1962) und REYNOLDS (1963).

Während die Untersuchungen über strukturelle und ultrastrukturelle Leberveränderungen durch Tetrachlorkohlenstoff noch in vollem Gange waren, beschäftigten sich einzelne Forscher bereits mit der Frage nach dem diesen Veränderungen zugrunde liegenden pathogenetischen Prinzip, oder anders ausgedrückt, nach dem zellulären Angriffspunkt des Tetrachlorkohlenstoffs.
CHRISTIE und JUDAH (1954) und JUDAH und REES (1959) vermuteten Störungen der mitochondrialen Funktionen als pathogenetisches Prinzip dieses Hepatotoxins. Aufgrund der Beobachtung, daß histologisch faßbare Veränderungen nach Tetrachlorkohlenstoff-Applikation bereits zu einem Zeitpunkt auftreten, da die mitochondrialen Funktionen biochemischen Parametern zufolge noch intakt sind, wiesen RECKNAGEL und LOMBARDI (1961), SMUCKLER, ISERI und

BENDITT (1961, 1962), BÖRNIG, RICHTER und FRUNDER (1960) und RICHTER (1962) auf Veränderungen des endoplasmatischen Retikulums als primäre Ursache der durch Tetrachlorkohlenstoff induzierten Leberzellschädigung hin.

V. OETTINGEN (1950) fand bei der Untersuchung der Organkonzentrationen nach Applikation von Tetrachlorkohlenstoff an Hunde die höchsten Werte im Knochenmark, Gehirn und Fettgewebe (vergl. ROBBINS, 1929; McCOLLISTER, 1950). Er fand nach akuter Intoxikation erwachsener Ratten ausgedehnte Nekrosen nur in der Leber, in der er ähnlich wie in Niere und Muskulatur jedoch nur wesentlich niedrigere Konzentrationen von Tetrachlorkohlenstoff als in Knochenmark, Gehirn und Fettgewebe finden konnte. Da nun die Leber unter den genannten Organen zweifellos die höchste Stoffwechselaktivität aufweist, schloß er auf einen Zusammenhang zwischen der Toxizität von Tetrachlorkohlenstoff und dessen Metabolismus in der Leber. Diese Hypothese der Toxizität des Tetrachlorkohlenstoffs durch seine Metabolisierung wurde bereits von McCOLLISTER, BEANER, ATCHINSON und SPENCER (1951) geäußert und von BUTLER (1961), RUBINSTEIN und KANICS (1964) und SLATER (1966) bestätigt. PAUL und RUBINSTEIN (1963) und RUBINSTEIN und KANICS (1964) gelang es, ein Enzymsystem in der Leber nachzuweisen, das zur Metabolisierung von Tetrachlorkohlenstoff fähig ist. McLEAN und McLEAN (1966), und SEAWRIGHT und McLEAN (1967) vermuteten dieses Enzymsystem im endoplasmatischen Retikulum. McLEAN und McLEAN (1966), GARNER und McLEAN

(1969) und LITTERST et al. (1975) berichteten von der Möglichkeit, die Hepatotoxizität des Tetrachlorkohlenstoffs bei Ratten durch Aktivierung des arzneimittelabbauenden Enzymsystems mittels Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital zu potenzieren. DALLNER et al. (1965) zeigten, daß die NADPH-Cytochrom P-450-Enzymkette in der Leber erwachsener Ratten gegenüber allen anderen Organen in der höchsten Konzentration vorkommt, während sie bei neugeborenen Ratten, für die Tetrachlorkohlenstoff eine erheblich geringere Toxizität als für erwachsene Tiere aufweist, nur in geringer Menge vorhanden ist. Andererseits gelang es McLEAN und McLEAN (1966) und UGAZIO et al. (1972), die Hepatotoxizität des Tetrachlorkohlenstoffs durch Substanzen, die die Aktivität des Fremdstoffe-metabolisierenden Enzymsystems der Leber hemmen, wesentlich herabzusetzen. POPOV et al. (1976) berichteten, daß viele Antagonisten der Toxizität des Tetrachlorkohlenstoffs ihre Wirkung über eine Hemmung des Tetrachlorkohlenstoff-metabolisierenden Enzymsystems ausüben. UGAZIO et al. (1972) und GLENDE (1972) gelang es, durch Vorbehandlung von Ratten mit kleinen Dosen von Tetrachlorkohlenstoff einen "Schutz"-Effekt gegenüber einer folgenden letalen Dosis von Tetrachlorkohlenstoff zu bewirken. Sie brachten die Suppression des mikrosomalen Enzymsystems durch die Vorbehandlung der Tiere mit kleinen Dosen von Tetrachlorkohlenstoff in ursächlichen Zusammenhang mit dem erzielten "Schutz"-Effekt. Schließlich be-

richteten TSYRLOV et al. (1972), daß eine zusätzliche hohe Dosis von Tetrachlorkohlenstoff nach Ausbildung einer Tetrachlorkohlenstoff-induzierten Leberzirrhose ihren toxischen Effekt weitgehend verliere. Durch die erwähnten und durch zahlreiche weitere Versuche konnte hinreichend gesichert werden, daß die Metabolisierung von Tetrachlorkohlenstoff Voraussetzung für seine Toxizität ist, und daß diese Metabolisierung im endoplasmatischen Retikulum der Leber unter Interaktion mit der NADPH-Cytochrom P-450-Enzymkette stattfindet.

BUTLER (1961) beobachtete, daß in Gewebshomogenaten, besonders der Leber, $CHCl_3$ aus Tetrachlorkohlenstoff entsteht und schlug die Möglichkeit der homolytischen Spaltung dieser neu entstandenen Verbindung durch Reaktion mit Gewebsthiolgruppen unter Freisetzung von Radikalen vor (auch WIRTSCHAFTER und CRONYN, 1964). GHOSHAL und RECKNAGEL (1965) und SLATER (1966) vermuteten $CCl_3^{\bullet}$-Radikale als toxische Metaboliten des Tetrachlorkohlenstoffs; diese könnten eine Folgereaktion mit den Thiolgruppen von Enzymproteinen, Nukleotiden und mit zahlreichen anderen benachbarten Verbindungen eingehen (LEWIS und WILLS, 1962; SLATER, 1969). Weitere Hinweise für das Auftreten homolytischer Spaltungen im Rahmen der Metabolisierung von Tetrachlorkohlenstoff erbrachte GORDIS (1969). RAO und RECKNAGEL (1969) berichteten über die Möglichkeit der Bindung von $CCl_3^{\bullet}$-Radikalen an benachbarte Moleküle.

Schließlich gelang es BINI et al. (1975), $CCl_3^{\bullet}$, C_2Cl_6 und $CHCl_3$ als Metabolite des Tetrachlorkohlenstoffs nachzuweisen.

$$CCl_4 + e^- \longrightarrow CCl_3^{\bullet} + Cl^-$$

Abb. 1: Mechanismus der homolytischen Spaltung des Tetrachlorkohlenstoffs. Unter Aufnahme eines Elektrons entsteht ein Trichlormethylradikal und ein Chloridion.

Die Bedeutung von Radikalen im Rahmen der Toxizität des Tetrachlorkohlenstoffs wird durch zahlreiche Versuche gestützt, in denen es gelang, durch Substanzen, die als Radikalfänger bekannt sind, die Toxizität des Tetrachlorkohlenstoffs zu vermindern.

Bereits HOVE (1948) beobachtete eine geringere Letalität von Ratten unter Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff bei gleichzeitiger Gabe von Vitamin E. GREEN (1972) konnte die Schutzwirkung von Vitamin E gegenüber der Toxizität des Tetrachlorkohlenstoffs bestätigen, PIETRONIGRO (1976) berichtete über eine ähnliche Wirkung der DNA. Eine zusammenfassende Darstellung Radikal-abfangender Substanzen verdanken wir SLATER und SAWYER (1971).

Nachdem HOCHSTEIN und ERNSTER (1963) über das Vorkommen von Material in isolierten Lebermikrosomen, das mit Thiobarbitursäure (TBA) in Gegenwart von NADPH und ADP eine Farbreaktion ergibt, berichtet hatten, zeigten

COMPORTI und SACCOCCI (1965), COMPORTI et al. (1965), DIANZANI et al. (1966) und RECKNAGEL und GHOSHAL (1965, 1966a,b,c) die Fähigkeit des Tetrachlorkohlenstoffs zur Auslösung der Lipidperoxidation, einer oxidativen Umstrukturierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren.

Die Lipidperoxidation kommt unter geeigneten Bedingungen nicht nur in biologischen Materialien - hier insbesondere in den mitochondrialen und mikrosomalen Membranstrukturen - vor, sondern stellt ein generelles Phänomen der organischen Natur bei Vorhandensein von Olefinen, von mehrfach ungesättigten Verbindungen, dar. Bekanntestes Beispiel derartiger oxidativer Umbauvorgänge ist die Autoxidation von Fetten in Milch-, Käse- und Fleischprodukten.

Chemisch handelt es sich bei der Lipidperoxidation um eine Kettenreaktion, die durch die Entstehung eines freien Radikals an einer Methylengruppe einer mehrfach ungesättigten Fettsäure initiiert wird. Durch Resonanz kommt es zur sukzessiven Wanderung der Doppelbindungen im Fettsäurerest und zur Dienkonjugation, die im UV-Licht durch eine charakteristische Wellenlänge (λ_{max} = 233nm) nachzuweisen ist. Unter Anlagerung von Sauerstoff an das radikalische C-Atom des Fettsäurerestes und Bildung eines Peroxids und Hydroperoxids, die ihrerseits wiederum mit weiteren mehrfach ungesättigten Fettsäuren unter Weitergabe der Radikalstruktur reagieren, breitet sich die Kettenreaktion lawinenartig aus. Im weiteren Verlauf

können durch Autokatalyse der Peroxide Bruchstücke entstehen, u.a. der Malondialdehyd (MDA), der mittels einer Farbreaktion mit TBA nachgewiesen werden kann. Schließlich bricht die Kette durch Reaktion zweier Radikale untereinander oder durch Abfangen freier Radikale mit Hilfe geeigneter benachbarter Verbindungen ab.

Start der Kettenreaktion:

$$PUFA(H) + R^{\bullet} \longrightarrow PUFA^{\bullet} + RH$$

Ausbreitung der Reaktion:

$$PUFA^{\bullet} + O_2 \longrightarrow PUFAO_2^{\bullet}$$

$$PUFAO_2^{\bullet} + PUFA(H) \longrightarrow PUFAO_2H + PUFA^{\bullet}$$

Abbruch der Kettenreaktion:

$$2\ PUFA^{\bullet} \longrightarrow \text{stabile Produkte}$$

$$2R^{\bullet} \longrightarrow \text{stabile Produkte}$$

$$PUFA^{\bullet} + PUFAO_2^{\bullet} \longrightarrow \text{stabile Produkte}$$

$$PUFA^{\bullet} + S \longrightarrow \text{stabile Produkte}$$

$$PUFAO_2^{\bullet} + S \longrightarrow \text{stabile Produkte}$$

$$R^{\bullet} + S \longrightarrow \text{stabile Produkte}$$

$$2\ PUFAO_2^{\bullet} \longrightarrow \text{stabile Produkte}$$

Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien der Lipidperoxidation nach SLATER (1975). PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäure (poly unsaturated fatty acid), S = Radikal-abfangendes Molekül

Im Falle des Tetrachlorkohlenstoffs können nun die bei der homolytischen Spaltung dieses Hepatotoxins freiwerdenden Radikale durch Interaktion mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren benachbarter Membranstrukturen die oben schmatisch dargestellten Vorgänge auslösen. Bei vermehrter Bildung von Radikalen aus Tetrachlorkohlenstoff und genügendem Substrat an mehrfach ungesättigten Fettsäuren werden schließlich die natürlichen Schutzmechanismen der Zelle überfordert. Eine wichtige Rolle im Rahmen dieser Schutzmechanismen spielt das Antioxidant Vitamin E (α-Tocopherol), das in der Lage ist, Radikale abzufangen und dadurch die Entstehung von Peroxiden zu verhindern. Bereits gebildete Lipidperoxide können mit Hilfe der Glutathionperoxidase wieder abgebaut werden. Werden jedoch die natürlichen Schutzmechanismen der Zelle gegenüber der oxidativen Umstrukturierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren überfordert, resultiert aus der Lipidperoxidation eine Desintegration der Membranlipide, die zu ausgedehnten Membranfunktionsstörungen führt, deren Folge letzten Endes der Untergang der Zelle ist.

Als Folgen derartiger peroxidativer Prozesse im Bereich der Leber werden lymphohistiozytäre Infiltrationen, Fettanreicherung und Zellnekrosen bis hin zum vollständigen zirrhotischen Umbau des Organs diskutiert; verschiedene Autoren bringen auch andere physiologische und pathologische Prozesse mit der Lipidperoxidation in Verbindung, beispielsweise Alterungsvorgänge (MUNKRES et al., 1976), Gefäßwand-

veränderungen, insbesondere im Sinne der Arteriosklerose (WILSON et al., 1973; JUCHAU et al., 1976).
CHAN (1976), BASSI (1975) und MUKAI et al. (1976) vermuteten Zusammenhänge zwischen Lipidperoxidation und Carcinogenese. Ferner wurde die Lipidperoxidation mit gewissen Formen der Hämolyse mittels aktiviertem Sauerstoff in Verbindung gebracht (MICHELSON, 1977).
RACHMILEWITZ (1976) diskutierte peroxidative Prozesse als pathogenetisch wichtigen Faktor bei der Entstehung der β-Thalassaemia major, MEFFERT et al. (1976) fanden Peroxid-Bruchstücke (Malondialdehyd, Schiff'sche Basen) in der menschlichen Haut und schlossen auf einen Zusammenhang zwischen dieser Peroxidbildung und Altersveränderungen der Haut. Ferner wurde die Lipidperoxidation in Verbindung gebracht mit der Entstehung von Lungenfibrosen, insbesondere der Silikose (CHVAPIL et al., 1976), zahlreichen Stoffwechselstörungen, beispielsweise des Steroidabbaus (NELSON et al., 1975), des Calciumstoffwechsels (MOORE et al., 1976) und der Prostaglandinsynthese (ROBAK et al., 1976; PRYOR et al., 1976).
DI LUZIO (1967) beschrieb die Rolle der Lipidperoxidation im Rahmen der alkoholischen Hepatopathie und erbrachte den Nachweis, daß Äthanol den peroxidativen Umbau ungesättigter Fettsäuren auszulösen vermag. Ein derartiger Zusammenhang zwischen Alkohol und Lipidperoxidation wurde bereits von NEW et al. (1962), V. OETTINGEN (1964) und GUILD et al. (1958) vermutet, die beobachtet hatten, daß

eine akute Intoxikation mit Tetrachlorkohlenstoff bei Menschen, die zum Zeitpunkt der Intoxikation Alkohol inkorporiert hatten, wesentlich dramatischer verlief als bei Personen ohne vorhergehenden Alkoholkonsum. MALING et al. (1975) bestätigten diese Beobachtungen und brachten sie in kausalen Zusammenhang mit der Lipidperoxidation. FOLLAND et al. (1976) und TRAIGER et al. (1976) konnten die Induktion der Lipidperoxidation auch durch andere Alkohole außer Äthanol nachweisen. REMMER et al. (1977) und KÖSTER et al. (1977) konnten vor kurzem ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der alkoholischen Hepatopathie und der Lipidperoxidation wahrscheinlich machen.

Nachdem es GHOSHAL und RECKNAGEL (1965) gelungen war, den direkten Beweis für die Induktion der Lipidperoxidation durch Tetrachlorkohlenstoff zu erbringen, rückte die Lipidperoxidations-Theorie als umfassendes Konzept der durch Tetrachlorkohlenstoff induzierten Hepatopathie immer mehr in den Mittelpunkt der Betrachtungen (SLATER, 1966; RECKNAGEL, 1967; DIANZANI, 1970; RAO und RECKNAGEL, 1968 und RECKNAGEL et al., 1974). Andererseits blieb die Lipidperoxidations-Theorie als pathogenetisches Konzept der durch Tetrachlorkohlenstoff induzierten Leberschädigung nicht ohne Kritik (KELLER et al., 1971; CASTRO et al., 1968, 1972 und 1973; SANCIER, 1976), bzw. wurde als möglicher Teilfaktor ohne wesentliche praktische Relevanz interpretiert (KLAASEN und PLAA, 1969;

McLEAN, 1967; CIGNOLI und CASTRO, 1971; CHOPRA et al., 1972).

Unterdessen unterstützten weitere Untersuchungen die Hypothese, daß die akute, durch Tetrachlorkohlenstoff induzierte Leberschädigung durch eine Radikalreaktion vermittelt wird, die die Lipidperoxidation mit einschließt (RECKNAGEL, 1967). COMPORTI et al. (1965), SLATER (1966b) und SLATER (1972) fanden eine erhöhte Produktion von MDA in Mikrosomen nach Tetrachlorkohlenstoff-Applikation. SCHNEIDER, SMITH und HUNTER (1964) und DESAI, SAWANT und TAPPEL (1964) konnten zeigen, daß $CCl_3^{\bullet}$-Radikale in Gegenwart von Sauerstoff mit ungesättigten Fettsäuren unter Bildung von Peroxiden reagieren. Aus der Beobachtung, daß die Stimulation der MDA-Produktion sich proportional zur Quadratwurzel der Konzentration des Tetrachlorkohlenstoffs im Inkubat verhält, folgerte SLATER (1972), daß die Lipidperoxidation nicht durch die Lösungsmittel-Eigenschaften des Tetrachlorkohlenstoffs bedingt sei, sondern über Radikalreaktionen, für die diese mathematische Beziehung typisch ist, verlaufe. Ebenso spricht der Vergleich der Bindungsstärken der verschiedenen durch Halogene substituierten Methane mit ihrer Fähigkeit zur Produktion von MDA für das Vorliegen eines Radikalmechanismus (SLATER, 1971).

Wie bereits ausgeführt, ist für die Hepatotoxizität des Tetrachlorkohlenstoffs dessen Metabolismus unabdingbare Voraussetzung. Da auch die durch Tetrachlorkohlen-

stoff induzierte enzymatische Lipidperoxidation keinen autokatalytischen Prozeß darstellt, sondern einer fortwährenden Oxidation von NADPH bedarf (MAY und McCAY, 1968), darf eine enge Wechselbeziehung zwischen dem Metabolismus von Tetrachlorkohlenstoff, der Lipidperoxidation, dem mikrosomalen Enzymsystem und den davon abhängigen Stoffwechselfunktionen der Leber angenommen werden.

SMUCKLER et al. (1967), SASAME et al. (1968), DINGELL und HEIMBERG (1968), CASTRO et al. (1968) und SLATER und RECKNAGEL (1969) fanden nach Applikation von Tetrachlorkohlenstoff eine Abnahme des Cytochrom P-450-Gehaltes der Lebermikrosomen. SEAWRIGHT und McLEAN (1967) beobachteten eine Verminderung der Cytochrom P-450-abhängigen Fremdstoffmetabolisierung nach Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und schlossen daraus auf eine Interaktion zwischen Aktivierung des Tetrachlorkohlenstoffs und Aktivität des Cytochroms P-450 mit der Folge des Abfalls des Cytochroms P-450 und der Hemmung des Cytochrom P-450 abhängigen Stoffwechsels, eine Folgerung, die bereits von NEUBERT und MAIBAUMER (1959) und CLIFFORD und REES (1966) diskutiert und durch KLINGER et al. (1968) bestätigt worden war.

ORRHENIUS et al. (1964), ERNSTER et al. (1967,1968), GRAM und FOUTS (1966) und WILLS (1969) vermuteten die NADPH-abhängige Cytochrom c Reduktase als gemeinsames Enzym der Lipidperoxidation und des NADPH-abhängigen

Fremdstoff-Metabolismus, die Reduktionsäquivalente für beide Reaktionen zur Verfügung stelle. Sie folgerten, daß die Lipidperoxidation durch Substrate, die sich der Metabolisierung durch die mischfunktionelle Oxidase unterziehen, gehemmt werde, was jedoch PEDERSON et al. (1972) auf die antioxidativen Eigenschaften dieser Substrate oder ihrer Metabolite und nicht auf die Konkurrenz beider Vorgänge um Reduktionsäquivalente zurückführten.

Wie bereits eingangs angedeutet wird die durch Tetrachlorkohlenstoff induzierte Hepatopathie vielfach als Modell für den Pathomechanismus zahlreicher Lebererkrankungen, die mit Fettanreicherung, lymphohistiozytären Infiltraten, Bindegewebsvermehrung und Zellnekrose einhergehen, herangezogen. Der Wert eines solchen Modells wird aber erst dann offenkundig, wenn es mit seiner Hilfe gelingt, den zellulären Angriffspunkt von Hepatotoxinen auf submikroskopischer Ebene zu erforschen und in Analogie hierzu durch Entwicklung geeigneter Pharmaka die verhängnisvollen Reaktionsketten mit all ihren deletären Folgen möglichst noch im Stadium ihrer Induktion zu blockieren.

Zwar sind zahlreiche Verbindungen bekannt, die insbesondere aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften in Teilprozesse der durch Tetrachlorkohlenstoff induzierten Hepatopathie einzugreifen und sie günstig zu beeinflussen vermögen, beispielsweise Vitamin E (HOVE,

1948; GALLAGHER, 1962; GHOSHAL, 1976), Selen (BENEDETTI et al., 1974; HOEKSTRA, 1975; RICHTER et al., 1975), ferner DPPD (GALLAGHER, 1962), Phenothiazine (SLATER, 1968), Cysteamin (CASTRO et al., 1972), Gallussäurepropylester (TORRIELLI und UGAZIO, 1975), doch scheitert ihre therapeutische Verwendbarkeit, die bereits von HARTMAN (1968), SLATER (1966) und RECKNAGEL (1967) für gewisse Substanzen dieser Reihe diskutiert wurde, an ihrer eigenen Toxizität bei Verabreichung therapeutisch wirksamer Dosen.

In dieser Situation der Lebertherapie, die gekennzeichnet ist durch keine oder relativ geringe therapeutische Wirksamkeit, will man nicht allzu großes therapeutisches Risiko eingehen, verdient eine neue Substanz, (+)-Cyanidanol-3 (Catechin) hinsichtlich ihrer therapeutischen und pharmakologischen Eigenschaften besondere Beachtung. Diese Substanz besitzt die Eigenschaften eines Radikalfängers und ist in der Lage, die Lipidperoxidation in vitro sehr effektiv zu hemmen (SLATER und EAKINS, 1975; KAPPUS et al., 1977).

Catechin ist eine heterozyklische Verbindung mit zwei aromatischen Ringen, die je zwei phenolische OH-Gruppen tragen, während der Heterozyklus eine alkoholische OH-Gruppe trägt. Nach der chemischen Nomenklatur handelt es sich um Tetrahydroxy-3′,4′,5 ,7,-flavanol-3 (vergl. Abb. 3, S. **20**).

Catechin gehört ebenso wie Rutin und das sog. Vitamin P der Gruppe der Flavonoide an, deren pharmakologische Eigenschaften bislang nur unvollständig erforscht sind (DAS und SOTHY, 1971; BÖHM, 1967). Die Erstbeschreibung eines "Cyanidanol-3" erfolgte durch RUNGE (1821). Im Jahre 1830 veröffentlichte NEES VON ESENBECK Beschreibungen pflanzlicher Extrakte aus Afrika, Amerika und Indien, die er als "kinos" und "catechins" bezeichnete. 1832 isolierte NEES VON ESENBECK aus verschiedenen Catechinen eine kristalline Substanz, die er "catéchine" nannte, eine Bezeichnung, die bis zum Jahre 1960 beibehalten wurde.

Toleranzuntersuchungen an Ratten ergaben eine LD 50 von über 10g/kg nach oraler Applikation. Nach täglichen Gaben von 0,8 bis zu 5,0g/kg für 1 Monat konnten bei Hunden und Ratten keine Schäden beobachtet werden (ZYMA, 1972). Auch vom Menschen werden Dosen von 4g/d, oral, gut toleriert (DAS, 1970). Ferner konnte im Tierversuch keine teratogene Wirkung von Catechin festgestellt werden (ZYMA, 1976).

Nach oraler Aufnahme wird Catechin rasch resorbiert ohne Beeinträchtigung durch die Magensäure (DAS, 1971). Der maximale Serumspiegel wird innerhalb 1-4 Std. erreicht (V. BERGMANN, 1974; GILES und GUMMA, 1973; BARENCO et al., 1973). Der Plasmaspiegel erreicht innerhalb von 2-3 Tagen den Wert von 1,7-3,0% der applizierten Dosis bei oraler Aufnahme von 2g/Tag. Die Elimination erfolgt über Sulfo-

und Glucuronsäurekonjugate der Metabolite durch Niere und Darm.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wirksamkeit von Catechin am experimentellen Modell der durch Tetrachlorkohlenstoff induzierten Leberschädigung aufzuzeigen. Dabei sollen die Hemmbarkeit der Lipidperoxidation durch Catechin, sein Einfluß auf die Cytochrome P-450 und b-5 und die NADPH-abhängige Cytochrom c Reduktase als wesentliche Bestandteile der mikrosomalen Enzymkette unter chronischer Belastung von Ratten mit Tetrachlorkohlenstoff untersucht werden. Im Zusammenhang mit der mikrosomalen Enzymfunktion soll ferner am Beispiel der p-Hydroxylierung von Anilin und der O-Demethylierung von p-Nitroanisol der Einfluß von Catechin auf die Metabolisierung von Fremdstoffen unter chronischer Tetrachlorkohlenstoff-Belastung von Ratten dargestellt werden. Schließlich soll mit Hilfe histologischer und histochemischer Methoden der Einfluß von Catechin auf lichtmikroskopisch faßbare Strukturveränderungen des Zellbildes mit Infiltrationen, Nekrosen und Regenerationen, ferner auf den Glykogengehalt der Leberzellen und den bindegewebigen Umbau unter chronischer Tetrachlorkohlenstoff-Applikation untersucht werden. In der anschließenden Diskussion werden die Ergebnisse im Hinblick auf andere Untersuchungen am Modell der durch Tetrachlorkohlenstoff induzierten Hepatopathie bewertet und in einen größeren Rahmen des Verständnisses dieses

Modells unter Berücksichtigung eventuell sich neu ergebener Aspekte eingereiht. Die Untersuchungen sind deshalb von besonderer Wichtigkeit, da Catechin erst kürzlich (1978) als Pharmakon in der Bundesrepublik Deutschland in den Handel eingeführt wurde (Handelsname: Catergen^{R}), obwohl über die Wirksamkeit dieses Präparates und über den möglichen therapeutischen Nutzen ebenso wie über den Wirkungsmechanismus keine klaren Vorstellungen bestehen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Für sämtliche Versuche wurden nur Chemikalien des höchsten vom Hersteller garantierten Reinheitsgrades verwendet.

$NADH_2$ (Dinatriumsalz), NADP (Dinatriumsalz), $NADPH_2$ (Tetranatriumsalz), ADP (krist. freie Säure), IDH (aus Schweineherz, 10mg Protein/ml in Glycerin) und Cytochrom c (aus Pferdeherz): Boehringer, Mannheim.

Serum-Albumin (vom Rind): Behringwerke AG, Marburg/Lahn.

DL-Isocitronensäure (Trinatriumsalz·$2H_2O$): Serva, Heidelberg.

Alle anderen Chemikalien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.

(+)-Catechin•$3H_2O$ wurde von der Fa. Fluka, Buchs (Schweiz) bezogen. Abbildung 3 zeigt die Strukturformel von (+)-Catechin.

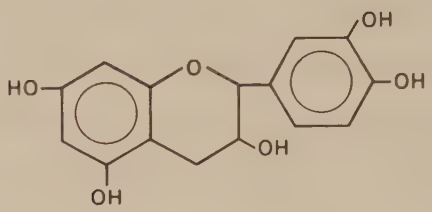

Abb. 3: Strukturformel von (+)-Catechin.

(+)-Catechin, im folgenden nur als Catechin bezeichnet, ist eine heterozyklische Verbindung, in der ein C-Atom durch Sauerstoff substituiert ist, mit zwei aromatischen Ringen. Diese tragen je zwei phenolische OH-Gruppen, während der Heterozyklus eine alkoholische OH-Gruppe trägt. Der Strukturformel entspricht die Summenformel $C_{15}H_{14}O_6$, das Molekulargewicht beträgt 290. Die Reinsubstanz besteht aus gelblich-weißen nadelförmigen Kristallen und hat einen adstringierenden Geschmack. Nach der chemischen Nomenklatur handelt es sich um (+)-Cyanidanol-3 oder Tetrahydroxy-3′,4′,5, 7, flavanol-3.

2.1.2. Puffer-Lösungen und Reagenzien

Sacharose-Lösung	250mM Sacharose in aqua dest.
Tris/HCl-Puffer	250mM Tris, mit HCl konz. auf pH 7,4 eingestellt.
Tris/KCl-Puffer	60mM KCl-Lösung: 250mM Tris-Puffer = 4:1, pH 7,4.
Nash-Reagenz	Ammoniumacetat 150 g Acetylaceton 2,0ml ad 1000ml H_2O, mit ca. 3ml Essigsäure konz. auf pH 6,0 eingestellt.
Alkalisches Kupfer-Reagenz	2% Na_2CO_3-Lösung 10ml 2,7% Kalium-Natri-umtartrat-Lösung 0,1ml 1% Kupfersulfat-lösung ($CUSO_4 \cdot 2H_2O$) 0,1 ml
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	die handelsübliche Lösung (Merck, Darmstadt) wurde mit aqua dest. im Verhältnis 1:1 verdünnt.

Neutrales gepuffertes Formol nach Lillie	40% Formol	100ml
	aqua dest.	900ml
	Natriumdihydrogenphosphat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	4,0g
	Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	6,5g
	pH der Gesamtlösung	7,0.

2.1.3. Geräte

Ultrazentrifuge Beckmann Spinco L 50, Sorvall-Kühlzentrifuge RC2-B, Eppendorf-Tischzentrifuge 3200, Zeiss-Photometer M4 QIII mit Zusatzgerät PM Q II, Unicam SP Zweistrahl-Ultraviolett-Spektralphotometer mit Unicam AR 25 Linear Recorder, Eppendorf-Thermostat 53 200.

2.2. Methoden

2.2.1. Präparation der Lebermikrosomen

Die Mikrosomenpräparation erfolgte nach der von REMMER et al. (1967) angegebenen Methode, jedoch wurde als Homogenisierungsmedium nur Sacharose-Lösung ohne Zusatz von EDTA verwendet. Die Tiere wurden durch Genickschlag getötet und ausgeblutet. Die freipräparierte Leber wurde anschließend von Bindegewebsresten befreit, gewogen und in eisgekühltem Homogenisierungsmedium (250mM Sacharose-Lösung) mit einer Schere zerkleinert. Der Überstand

wurde abgegossen und die so zerkleinerte Leber zusammen mit dem 6,5fachen ihres Volumens an Sacharose-Lösung homogenisiert (Potter-Homogenisator). Nach Abzentrifugierung der Zelltrümmer, Zellkerne und Mitochondrien in der Sorvall-Kühlzentrifuge ($0^{o}C$) bei 10 000g über 10 min wurde der Überstand 45 min lang bei 105 000g zentrifugiert, die sedimentierten Mikrosomen in KCl/Tris-Puffer resuspendiert und erneut 45 min lang bei 105 000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in KCl/Tris-Puffer aufgenommen und nach Einstellung des Proteingehaltes (s. unter 2.2.2.) für die Meßansätze verwendet.

2.2.2. Bestimmung des mikrosomalen Proteins

Der Proteingehalt der Mikrosomensuspension wurde nach der von LOWRY et al. (1951) angegebenen Methode bestimmt. Hierzu wurde ein Gemisch, bestehend aus 0,2ml einer 1N NaOH-Lösung, 0,2ml Mikrosomensuspension und 2,0ml alkalischem Kupfer-Reagenz, 10 min lang bei Zimmertemperatur vorinkubiert und anschließend mit 0,2 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz versetzt und erneut 30 min lang inkubiert, ebenfalls bei Zimmertemperatur. Danach wurde im Photometer bei 720nm die Extinktion gegen einen gleich behandelten Leerwert gemessen. Als Standard diente eine Rinder-Serumalbumin-Lösung mit bekanntem Proteingehalt (10mg/ml), die demselben Verfahren unterworfen wurde. Die Berechnung des mikrosomalen Proteingehaltes erfolgte

aus dem Quotienten der gemessenen Extinktionen für Mikrosomensuspension und Standard. Anschließend wurde der Proteingehalt der Mikrosomensuspension mit KCl/Tris-Puffer auf eine Konzentration von 5mg mikrosomales Protein/ml Suspension eingestellt.

2.2.3. Bestimmung der Cytochrome P-450 und b-5

Der Gehalt der Mikrosomensuspension an Cytochrom P-450 und Cytochrom b-5 wurde nach der von OMURA und SATO (1964) beschriebenen Methode durch Messung der Differenzspektren bestimmt. Beide Cytochrome lassen sich in einem Ansatz messen, da Cytochrom b-5 nach Reduktion durch $NADH_2$ kein CO bindet, während Cytochrom P-450, das zwar langsam durch $NADH_2$, jedoch rasch durch Natriumdithionit reduziert wird, CO zu binden vermag.

Meßansatz für Cytochrom b-5:

	Meßküvette	Referenzküvette
Mikrosomensuspension	0,5 ml	0,5ml
KCl/Tris-Puffer	1,5 ml	1,5ml
$NADH_2$ (10mg/0,5ml)	0,01ml	---

Nach Registrierung der Null-Linie wurde Cytochrom b-5 durch Zugabe von 0,01ml $NADH_2$ in die Meßküvette reduziert und das Differenzspektrum im Bereich von 380-600nm mit dem Unicam SP 1800 UV-Spektralphotometer aufgenommen. Die Konzentration des Cytochroms b-5 wurde aus der

Extinktionsdifferenz $E_{424}-E_{410}$ unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 18,5 \times 10^4 cm^2 Mol^{-1}$, des Verdünnungsfaktors und des mikrosomalen Proteingehaltes berechnet.

Meßansatz für Cytochrom P-450:

	Meßküvette	Referenzküvette
Mikrosomensuspension	0,5ml	0,5ml
KCl/Tris-Puffer	1,5ml	1,5ml
Natriumdithionit	einige Körnchen	einige Körnchen
CO-Begasung	30 sec	---

Im Anschluß an die Bestimmung des Cytochromes b-5 wurden beide Cytochrome durch Zugabe einiger Körnchen Natriumdithionit in Meß- und Referenzküvette vollständig reduziert. Nach Registrierung der Null-Linie wurde die Meßküvette 30 sec lang mit CO begast und anschließend das Differenzspektrum im Bereich zwischen 380 und 600nm mit dem Unicam UV-Spectralphotometer aufgenommen. Der Gehalt der Mikrosomensuspension an Cytochrom P-450 wurde aus der Extinktionsdifferenz $E_{450}-E_{490}$, wiederum unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 9,1 \times 10^4 cm^2 Mol^{-1}$, sowie des Verdünnungsfaktors und der mikrosomalen Proteinkonzentration, berechnet.
Abbildung 4 zeigt typische Differenzspektren von Cytochrom P-450 und Cytochrom b-5.

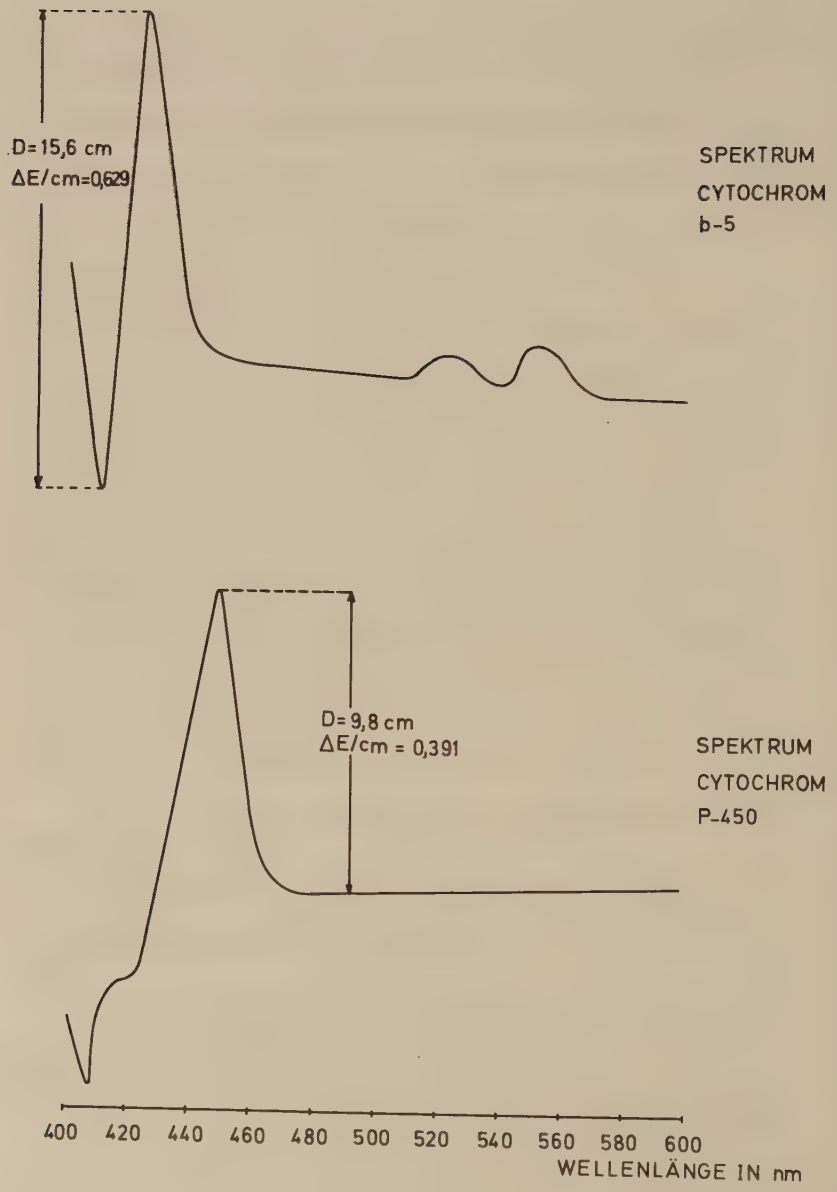

Abb. 4: Text s. S. 27

Zu Abb. 4: Differenzspektren von Cytochrom b-5 (oben) und Cytochrom P-450 (unten).
Cytochrom b-5: D = Extinktionsdifferenz $E_{424}-E_{410}$ in cm.
Cytochrom P-450: D = Extinktionsdifferenz $E_{450}-E_{490}$ in cm.

2.2.4. Bestimmung der NADPH-abhängigen Cytochrom c Reduktase

Die Messung dieses Flavinenzyms erfolgte nach der von T. OMURA und S. TAKASUE (1970) angegebenen Methode.

Meßansatz (Meßküvette und Referenzküvette):

0,1M Phosphatpuffer, pH 7,5	0,3ml
Cytochrom c (5mg/ml)	0,3ml
KCN (3mM)	0,3ml
Mikrosomensuspension	0,1ml
aqua dest.	2,0ml

Nach Vorinkubation des Reaktionsgemisches über 5 min im Wasserbad bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,01 ml $NADPH_2$ (10mM) in die Meßküvette gestartet und die Extinktionsänderung bei 550nm mit dem Unicam Spektralphotometer 5 min lang registriert. Der Berechnung des Gehaltes der Mikrosomensuspension an NADPH-Cytochrom c Reduktase wurde der von OMURA und TAKASUE (1970) angegebene molare Extinktionskoeffizient $\varepsilon = 21,1 \times 10^6 cm^2 Mol^{-1}$ zugrunde gelegt.

2.2.5. Bestimmung der O-Demethylierung von p-Nitro-Anisol

P-Nitro-Anisol wird über eine hydroxylierende O-Demethylierung zu p-Nitro-Phenol umgesetzt. Der dabei entstehende Formaldehyd wird nach der Methode von NASH (1953) bestimmt.

Inkubationsansatz:

p-Nitro-Anisol	0,1ml
Magnesiumchlorid (0,05M)	0,1ml
Na-Isocitrat (0,08M)	0,1ml
Mikrosomensuspension	0,3ml
Tris/HCl-Puffer, pH 7,4	0,3ml
IDH	0,005ml

Nach 5 min langer Vorinkubation im Wasserbad bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1ml NADP (10mM) gestartet. Die Reaktion wurde nach 3, 6 und 9 min durch Einpipettieren von 0,3ml des Inkubates in jeweils 0,3ml einer 7,5%igen TCA-Lösung gestoppt. Zum Nachweis des bei der Reaktion entstandenen Formaldehydes wurde das Inkubat-TCA-Gemisch in der Eppendorf-Tischzentrifuge 2 min lang zentrifugiert, 0,5ml des TCA-Überstandes zusammen mit 0,5ml Nash-Reagenz und 1,0ml aqua dest. im Wasserbad bei 58°C 12 min lang inkubiert und nach Abkühlung des Inkubats die Extinktion bei 412nm im Photometer gegen einen gleich behandelten Leerwert gemessen. Die Berechnung der Menge des gebildeten Formaldehydes erfolgt mit Hilfe einer Eichkurve (E_{412} = 0,100 entspricht 49,3nMol Formaldehyd/

ml Inkubat).

2.2.6. Bestimmung der p-Hydroxylierung von Anilin

Die Messung der Hydroxylierungsrate von Anilin erfolgte nach der von SCHENKMAN et al. (1967) angegebenen Methode.

Inkubationsansatz:

Anilin (0,16M)	0,1ml
Magnesiumchlorid (0,05M)	0,1ml
Na-Isocitrat (0,08M)	0,1ml
Mikrosomensuspension	0,3ml
IDH	0,005ml

Durch Zugabe von 0,1ml NADP (10mM) wurde die Reaktion nach 5 min langer Vorinkubation im Wasserbad bei 37°C gestartet. Der Reaktionsablauf wurde nach 3, 6 und 9 min durch Entnahme von jeweils 0,3ml des Inkubats und Einpipettieren in je 0,3ml einer 15%igen TCA-Lösung gestoppt. Nach Zentrifugation des TCA-Inkubat-Gemisches in der Eppendorf-Tischzentrifuge über 2 min wurden 0,5ml des TCA-Überstandes mit 0,5ml Phenolreagenz und 0,5ml einer 1M Na_2CO_3-Lösung versetzt. Der dabei entstandene Farbstoff wurde nach 30 min bei 630nm im Photometer gegen einen gleich behandelten Leerwert gemessen. Die Berechnung des gebildeten Aminophenols erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve (E_{630} = 0,100 entspricht 20,6nMol Aminophenol/ml Inkubat).

2.2.7. Bestimmung der Lipidperoxidation.

Das Ausmaß der Lipidperoxidation in den Mikrosomensuspensionen wurde in Anlehnung an SMUCKLER (1967) nach der Modifikation von KAPPUS et al. (1977) mittels einer Farbreaktion des bei der Lipidperoxidation entstehenden Malondialdehydes (MDA) mit Thiobarbitursäure (TBA) gemessen.

Inkubationsansatz:

KCl/Tris-Puffer	0,9ml
Mikrosomensuspension	0,2ml

Nach 5 min langer Vorinkubation bei 37°C im Eppendorf-Thermostat wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1ml $NADPH_2$ (10mM) gestartet. Durch Entnahme von jeweils 0,2ml des Inkubats und Einpipettieren in je 0,4ml einer 15%igen TCA-Lösung wurde der Reaktionsablauf nach 3, 6, 9 und 12 min beendet. Zur Farbreaktion des bei der Reaktion entstandenen MDA wurde das Inkubat-TCA-Gemisch 2 min lang in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert, 0,5ml des TCA-Überstandes mit 0,5ml einer 1%igen TBA-Lösung (pH 7,0) versetzt und 10 min lang im Eppendorf-Thermostat bei 95°C erhitzt. Nach Abkühlung des Gemisches wurde die Extinktion des entstandenen Farbstoffes bei 535nm im Photometer gegen einen gleich behandelten TCA-Leerwert gemessen. Die Menge des gebildeten MDA wurde mit Hilfe einer Eichkurve berechnet, die mittels einer Verdünnungsreihe von Malondialdehyd-Diäthylacetal

gewonnen wurde. Abbildung 5 zeigt einen typischen Verlauf der Lipidperoxidation, dargestellt in nMol MDA/mg mikrosomales Protein, bei der in vitro-Inkubation von Lebermikrosomen nach Behandlung der Tiere mit Tetrachlorkohlenstoff.

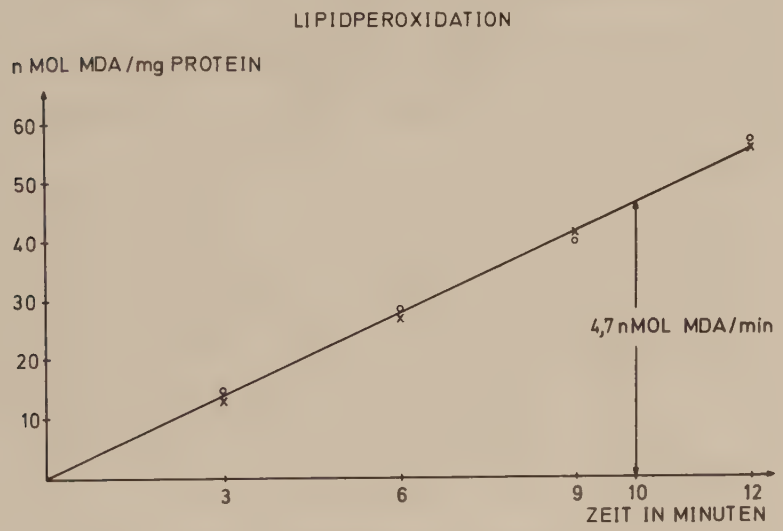

Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der Lipidperoxidation, dargestellt in nMol MDA/mg mikrosomales Protein, der mittels einer Farbreaktion mit TBA gemessen wurde, bei der in vitro-Inkubation der Lebermikrosomen von Tieren, die mit Tetrachlorkohlenstoff vorbehandelt wurden.

2.2.8. Methoden zur histologischen Untersuchung

2.2.8.1. Fixierung der histologischen Präparate

Von jeder getöteten Ratte wurde nach Freipräparation der Leber ein etwa 0,5 x 1 cm großes Leberstückchen mit Hilfe einer Rasierklinge zur histologischen Untersuchung isoliert. Die Leberstückchen wurden jeweils unmittelbar nach ihrer Isolierung in gepuffertes Formol nach Lillie zur Fixierung gebracht und anschließend bei +4°C im Kühlschrank bis zur Weiterbehandlung aufbewahrt. Formol wurde einerseits wegen seines guten Diffusionsvermögens und der geringen Niederschlagsbildungen, andererseits aufgrund der guten Haltbarkeit und des zum Schneiden günstigen Härtegrades der in diesem Medium fixierten Präparate verwendet.

2.2.8.2. Nachbehandlung der fixierten Präparate: Auswaschen und Entwässern

Nach genügend langer Fixierung (mindestens 5 Tage) wurde die Fixierungsflüssigkeit mit aqua dest. ausgewaschen und die Präparate zur Einbettung in Paraffin durch Übertragen in wasserfreies Äthanol entwässert. Um dabei eine allzu große Beeinträchtigung der Präparate durch Schrumpfung und Zerreißung zu vermeiden, erfolgte die Entwässerung stufenweise, indem die Präparate für jeweils 24 Stunden nacheinander in 50, 60, 70, 80 und

96%iges Äthanol gelegt wurden. Zur Entfernung des letzten Wassergehaltes wurden die Präparate anschließend für 24 Stunden in absoluten Alkohol gelegt. Die Entwässerung erfolgte ausschließlich mit unvergälltem Alkohol, da über den möglichen Einfluß der Vergällungsmittel auf mikroskopische und submikroskopische Strukturen der Präparate keine hinreichenden Angaben vorliegen (ROMEIS, 1968).

2.2.8.3. Einbettung in Paraffin

Das klassische Einbettungsverfahren in Paraffin wurde insbesondere wegen der günstigen Eigenschaften dieses Mediums hinsichtlich der Schneidbarkeit, Färbbarkeit und Haltbarkeit der Präparate angewendet. Zunächst wurde der zur vollständigen Entwässerung verwendete absolute Alkohol mittels Durchtränken in einem Zwischenmedium (Methylbenzoat-Benzol) wieder entfernt (Entspritung).
Zur Einbettung wurden handelsübliche "gereinigte Paraffine" mit einem Schmelzbereich von 56-58^{o}C verwendet. Die eigentliche Einbettung erfolgte maschinell mit Hilfe des Autotechnicons, einem von der Technicon Company eingeführten Apparat, der einen automatischen Ablauf des Einbettungsvorganges gestattet. Hierzu wurden die Gewebsstücke in kleine Gefäße gelegt, die ihrerseits in einen größeren Behälter eingebracht wurden, der maschinell durch einzelne Flüssigkeiten geführt werden

kann. Dabei wird der Behälter mit den Präparaten durch eine Rotationsvorrichtung in ständiger Bewegung gehalten, wodurch eine gleichmäßige, rasche Durchtränkung mit dem entsprechenden Medium erreicht wird.

2.2.8.4. Schneiden der in Paraffin eingebetteten Präparate

Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms der Fa. Jung (Heidelberg) wurden etwa 6 µ dicke Schnitte der einzelnen Präparate angefertigt.

2.2.8.5. Aufkleben der Schnitte

Die mit Hilfe des Mikrotoms gewonnenen Schnitte wurden auf saubere, ungebrauchte Objektträger aus weißem Glas, die zuvor in 96%igen Alkohol eingelegt und mit einem nichtfasernden Tuch abgetrocknet wurden, gelegt. Danach wurden die Schnitte mit Hilfe einer Eiweißglycerinlösung (MAYER, 1883) auf die Objektträger aufgeklebt.

2.2.8.6. Weiterbehandlung der aufgeklebten Schnitte

Um eine mikroskopische Betrachtung der Schnitte zu ermöglichen, ist es notwendig, das Einbettungsmittel (Paraffin) wieder zu entfernen. Dazu wurden die aufgeklebten Schnitte nach völligem Trocknen für ca. 5 min in Xylol gelegt. Nach Ablösen des Paraffins wurden die Präparate für 5 min in absoluten Alkohol übertragen,

anschließend jeweils 2 min in 96, 80 und 60%igen Alkohol und schließlich in Wasser gelegt.

2.2.8.7. Färbung der Schnitte

Zur histologischen Darstellung der durch Tetrachlorkohlenstoff induzierten Zell- und Gewebsveränderungen wurden von jedem Präparat vier verschiedene Färbungen angefertigt, und zwar

a) Hämatoxilin-Eosin (HE) nach EHRLICH (1886)
b) Periodic-acid-Schiff-reaction (PAS-Reaktion) nach McMANUS (1946) und HOTCHKISS (1948)
c) Trichrom nach MASSON (1923) in der Modifikation nach GOLDNER (1937)
d) Silberimprägnation in der Modifikation nach LENDRUM.

2.2.8.8. Mikrophotographie der Schnitte und Herstellung von Schwarz-Weiß-Positiven

Aus jeder Behandlungsserie wurden bezüglich der histologischen Veränderungen charakteristische und repräsentative Schnitte mikrophotographiert und anschließend Positive in Schwarz-Weiß des einheitlichen Formates 16,5 x 11 cm hergestellt.

2.2.9. Versuchstiere und Tierhaltung

Für sämtliche Versuche wurden männliche Wistar-Ratten der Versuchstierzuchtanstalt S. Ivanovas KG, Kisslegg/ Allgäu, verwendet. Die Tiere wurden in klimatisierten Räumen bei normalem Hell-Dunkel-Rhythmus untergebracht. Trockenfutter (Altromin^{R}) und Leitungswasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Applikation von Tetrachlorkohlenstoff, Catechin und Boratpuffer erfolgte als einmalige tägliche Gabe jeweils vormittags um 8 Uhr mit Hilfe einer Magensonde. Das Durchschnittsgewicht der Tiere bei Versuchsbeginn lag bei ca. 170g, das Gewicht beim Töten der Tiere streute je nach Art der Behandlung zwischen 100 und 350g. Die Tiere wurden in 4 verschiedenen Versuchsserien wie folgt behandelt:

Serie 1: Die Versuchstiere wurden in 2 Gruppen aufgeteilt, wobei die eine Gruppe gleichzeitig mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin, gelöst in Boratpuffer, behandelt wurde, während die andere nur Tetrachlorkohlenstoff erhielt.

Serie 2: Sämtliche Tiere wurden gleichzeitig mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin, gelöst in Boratpuffer, behandelt. Vor Einsetzen der Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin, gelöst in Boratpuffer, wurden sie jedoch zunächst 2 Wochen lang aus-

schließlich mit Catechin vorbehandelt.

Serie 3: Die Tiere erhielten nur Catechin, gelöst in Boratpuffer, und dienten als Kontrolle.

Serie 4: Die Tiere dieser Serie wurden ausschließlich mit Boratpuffer behandelt und dienten als Kontrolle für das verwendete Lösungsmittel (s. unten).

Für sämtliche Versuchsserien wurde eine einheitliche Dosierung gewählt, und zwar wurde Tetrachlorkohlenstoff in einer Dosis von 0,5ml/kg/Tag und Catechin in einer Dosis von 300 mg/kg/Tag appliziert. Tetrachlorkohlenstoff wurde in Olivenöl im Mischungsverhältnis Tetrachlorkohlenstoff : Olivenöl = 1 : 4 verabreicht. Catechin wurde in Boratpuffer (3,1%ige wässrige Lösung, pH 10,7) in einer Konzentration von 150mg Catechin/ml Lösung appliziert. Diese Lösung von Catechin in Boratpuffer wurde täglich frisch zubereitet. Die letzte Behandlung erfolgte jeweils 24 Stunden vor dem Töten der Tiere.

2.2.10. Fehlerberechnung

Für jeden Versuch wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Signifikanz wurde nach dem "Students-t-Test" ermittelt. Bedingt durch den Tod einiger Tiere und durch experimentelle Erfordernisse konnten gelegentlich nur 3 oder weniger Tiere getötet werden. Diese sog. Einzelwerte wurden ebenfalls in die Berechnung miteinbezogen.

3. Ergebnisse

3.1. Gewichtsverlauf der Tiere

Abbildung 6 zeigt die Gewichtsentwicklung der Tiere, dargestellt in Prozent des Ausgangswertes vor Einsetzen der Behandlung (durchschnittlich 170g), in Abhängigkeit von Art und Dauer der Behandlung.

Die Kurven der beiden Kontrollserien (Boratpuffer und Catechin/Boratpuffer) zeigen qualitativ und quantitativ denselben Verlauf. Die Gewichtszunahme der Tiere dieser beiden Versuchsserien entspricht dem Gewichtsverlauf unbehandelter Tiere. Damit ist ein Einfluß von Catechin selbst auf die Gewichtsentwicklung der Tiere ausgeschlossen.

Abb. 6: Gewichtsverlauf der Tiere unter den verschiedenen Behandlungsarten.

= Boratpuffer

= Catechin, gelöst in Boratpuffer

= CCl_4 (Tetrachlorkohlenstoff)

Das Gewicht der Tiere vor Einsetzen der Behandlung wurde als 100% festgelegt. n = Anzahl der zum entsprechenden Zeitpunkt gewogenen Tiere. Die Standardabweichungen der Meßwerte sind auf den einzelnen Säulen dargestellt. Die beiden schwarz ausgefüllten Säulen der untersten Versuchsreihe kennzeichnen Meßwerte von Tieren, deren Behandlung 2 Wochen nach Einsetzen der gleichzeitigen Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin abgesetzt wurde.

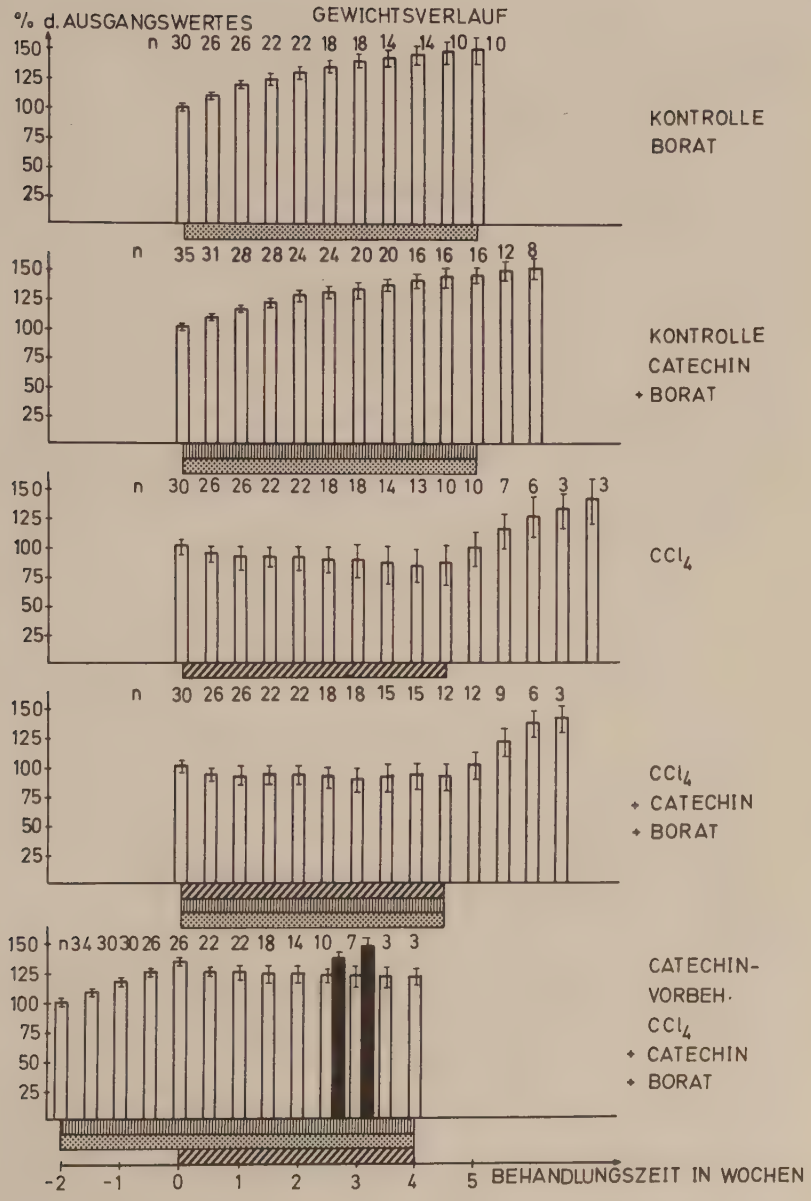
% d. AUSGANGSWERTES
GEWICHTSVERLAUF
n 30 26 26 22 22 18 18 14 14 10 10
KONTROLLE
BORAT
n 35 31 28 28 24 24 20 20 16 16 16 12 8
KONTROLLE
CATECHIN
+ BORAT
n 30 26 26 22 22 18 18 14 13 10 10 7 6 3 3
CCl4
n 30 26 26 22 22 18 18 15 15 12 12 9 6 3
CCl4
+ CATECHIN
+ BORAT
n 34 30 30 26 26 22 22 18 14 10 7 3 3
CATECHIN-
VORBEH.
CCl4
+ CATECHIN
+ BORAT
150
125
100
75
50
25
-2 -1 0 1 2 3 4 5 BEHANDLUNGSZEIT IN WOCHEN

Abb. 6

Dasselbe trifft auch für das Lösungsmittel von Catechin, den Boratpuffer, in der gewählten Dosierung, zu.

Ein anderer Verlauf stellt sich unter ausschließlicher Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff dar. Auf einen raschen Gewichtsabfall während der ersten Tage der Behandlung folgt eine weitere kontinuierliche Gewichtsabnahme bis zum Ende der 4-wöchigen Behandlungsdauer, und zwar bis auf 85% des Ausgangswertes. Dieser Gewichtsverlust wird innerhalb weniger Tage nach Absetzen der Behandlung wieder aufgeholt. Die Tiere erreichen 3 Wochen nach Absetzen der Behandlung ein Gewicht von 130% des Ausgangswertes und damit annähernd das Gewicht der Kontrolltiere.

Ein qualitativ gleicher Verlauf der Gewichtsentwicklung zeigt sich unter gleichzeitiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin. Der im Vergleich zur ausschließlichen Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff etwas geringere Gewichtsabfall während der 4-wöchigen Behandlung ($p \geq 0{,}075$) und die beschleunigte Gewichtszunahme nach Absetzen der Behandlung lassen einen günstigen Einfluß von Catechin vermuten.

Werden die Tiere vor Einsetzen der gleichzeitigen Behandlung mit Catechin und Tetrachlorkohlenstoff 2 Wochen lang ausschließlich mit Catechin vorbehandelt, ergeben sich nach Einsetzen der gleichzeitigen Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Tieren ohne Vorbehandlung mit Catechin ($p \geq 0{,}1$).

3.2. Lipidperoxidation

Abbildung 7 veranschaulicht das Ausmaß der Lipidperoxidation bei der Inkubation der Lebermikrosomen in vitro, dargestellt in nMol MDA/mg mikrosomales Protein, unter den verschiedenen Arten der Behandlung in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer.

Die Werte der mit Boratpuffer behandelten Kontrolltiere streuen um den Ausgangswert. Der Boratpuffer übt daher in der verwendeten Dosierung (2ml einer 3,1%igen Lösung/kg/Tag) keinen prooxidativen Effekt aus.

Die Behandlung mit Catechin führt zu einer vollständigen Abnahme der "endogenen" Lipidperoxidation bei der in vitro Inkubation der Lebermikrosomen ($p = 0,02$).

Anders stellt sich der Verlauf unter ausschließlicher Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff dar. Nach einer langen Anlaufphase von etwa 2 Wochen mit nur unwesentlicher Zunahme der Produktion von MDA während der in vitro Inkubation der Lebermikrosomen kommt es in der 3. Behandlungswoche zu einem Anstieg auf das 3- bis 4fache des Ausgangswertes. Nach 3 Wochen erreicht dieser Anstieg sein Maximum mit ca. 900 oder 1000 % des Ausgangswertes. Zu beachten ist ferner die Persistenz des Maximalwertes auch 1/2 Woche nach Absetzen der Behandlung. Nach einer weiteren halben Woche sind nur noch ca. 40% des Maximalwertes der Lipidperoxidation nachzuweisen. 4 Wochen nach Absetzen der Behandlung wird der Ausgangswert wieder erreicht.

Unter zusätzlicher Applikation von Catechin zeigt sich ein wesentlich geringerer Anstieg der MDA-Produktion, gemessen bei der in vitro Inkubation der Lebermikrosomen. Bereits 2 Wochen nach Einsetzen der Behandlung wird das Maximum mit 200% des Ausgangswertes erreicht. Dieser Wert ändert sich im weiteren Verlauf der Behandlung nicht wesentlich. Wiederum ist die Persistenz des Maximalwertes auch 1/2 Woche nach Absetzen der Behandlung zu beachten, während nach einer weiteren halben Woche der Ausgangs-

Abb. 7: Verlauf der Lipidperoxidation bei der in vitro Inkubation der Lebermikrosomen unter den verschiedenen Behandlungsarten.

= Boratpuffer

= Catechin, gelöst in Boratpuffer

= CCl_4 (Tetrachlorkohlenstoff)

n = Anzahl der untersuchten Tiere. Die Standardabweichungen der Meßwerte sind auf den einzelnen Säulen dargestellt. Die Bezeichnung nm (nicht meßbar) steht für geringe Meßwerte, die aufgrund der Meßgenauigkeit nicht sicher reproduzierbar sind. Die schwarz **ausgefüllten Säulen** der untersten Versuchstier-Serie **kennzeichnen** Meßwerte von Tieren, deren Behandlung 2 Wochen nach Einsetzen der gleichzeitigen Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin abgesetzt wurde.

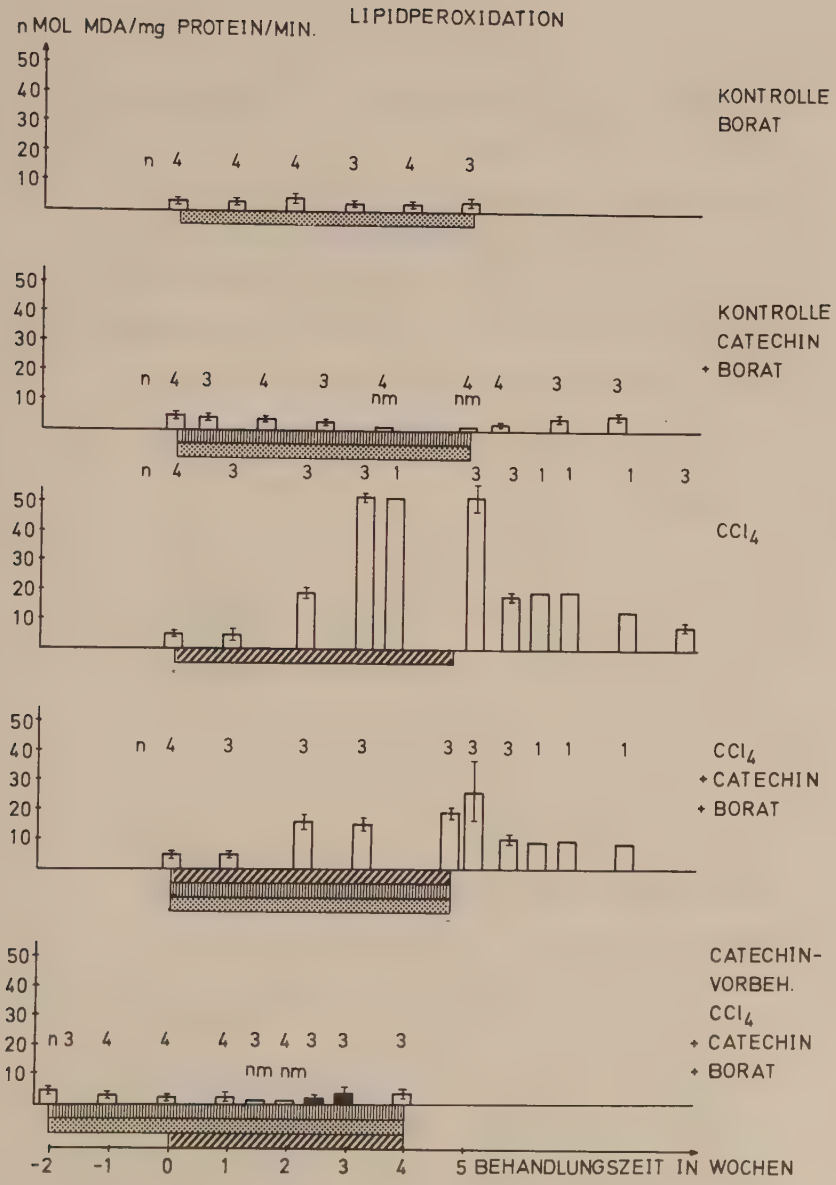
n MOL MDA/mg PROTEIN/MIN.
LIPIDPEROXIDATION
KONTROLLE
BORAT
KONTROLLE
CATECHIN
+ BORAT
CCl4
CCl4
+ CATECHIN
+ BORAT
CATECHIN-
VORBEH.
CCl4
+ CATECHIN
+ BORAT
nm
5 BEHANDLUNGSZEIT IN WOCHEN

Abb. 7

wert nahezu wieder erreicht wird.

Einen unerwarteten Effekt zeigt die Vorbehandlung mit Catechin. Nach Einsetzen der gleichzeitigen Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin kann kein Anstieg der MDA-Produktion nachgewiesen werden. Diese scheint eher noch, ähnlich der Catechin-Kontrollserie, während der Behandlung auf nicht meßbare Werte abzufallen, um nach Absetzen der Behandlung wieder auf den Ausgangswert anzusteigen.

3.3. Cytochrom P-450

In Abbildung 8 ist der Verlauf des Cytochrom P-450-Gehaltes der Lebermikrosomen, ausgedrückt in Prozent des Ausgangswertes (100% entsprechen 0,67nMol Cytochrom P-450/mg mikrosomales Protein), in Abhängigkeit von Art und Dauer der Behandlung dargestellt.

Auch auf diesen wichtigen Parameter der mikrosomalen Enzymkette zeigen Boratpuffer und Catechin in den gewählten Dosierungen - wie die Kurven der beiden Kontrollserien erkennen lassen - keinen Einfluß. Der scheinbare Abfall von Cytochrom P-450 unter der Behandlung mit Catechin ist statistisch nicht signifikant ($p \geq 0,1$).

Unter Applikation von Tetrachlorkohlenstoff fällt der Cytochrom P-450-Gehalt der Lebermikrosomen bereits nach 1- bis 2wöchiger Behandlungsdauer auf

sein Minimum (30-40% des Ausgangswertes) ab und zeigt im weiteren Verlauf der Behandlung eine leichte Erholungstendenz.

Schon 1 Woche nach Absetzen der Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung wird der Ausgangswert wieder erreicht, nach einer weiteren Woche wird er bereits um 30% des Ausgangswertes überschritten und liegt somit im Bereich der mit Boratpuffer behandelten Kontrollserie.

Abb. 8: Verlauf des Cytochrom P-450-Gehaltes der Lebermikrosomen der Versuchstiere unter den verschiedenen Behandlungsarten.

= Boratpuffer

= Catechin, gelöst in Boratpuffer

= CCl_4 (Tetrachlorkohlenstoff)

Der Gehalt der Lebermikrosomen an Cytochrom P-450 (nMol/mg mikrosomales Protein) vor Einsetzen der Behandlung wurde als 100% festgelegt.

n = Anzahl der zum entsprechenden Zeitpunkt untersuchten Tiere. Die Standardabweichungen der Meßwerte sind auf den einzelnen Säulen dargestellt. Die schwarz ausgefüllte Säule der untersten Versuchsserie kennzeichnet Meßwerte von Tieren, deren Behandlung 2 Wochen nach Einsetzen der gleichzeitigen Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin abgesetzt wurde.

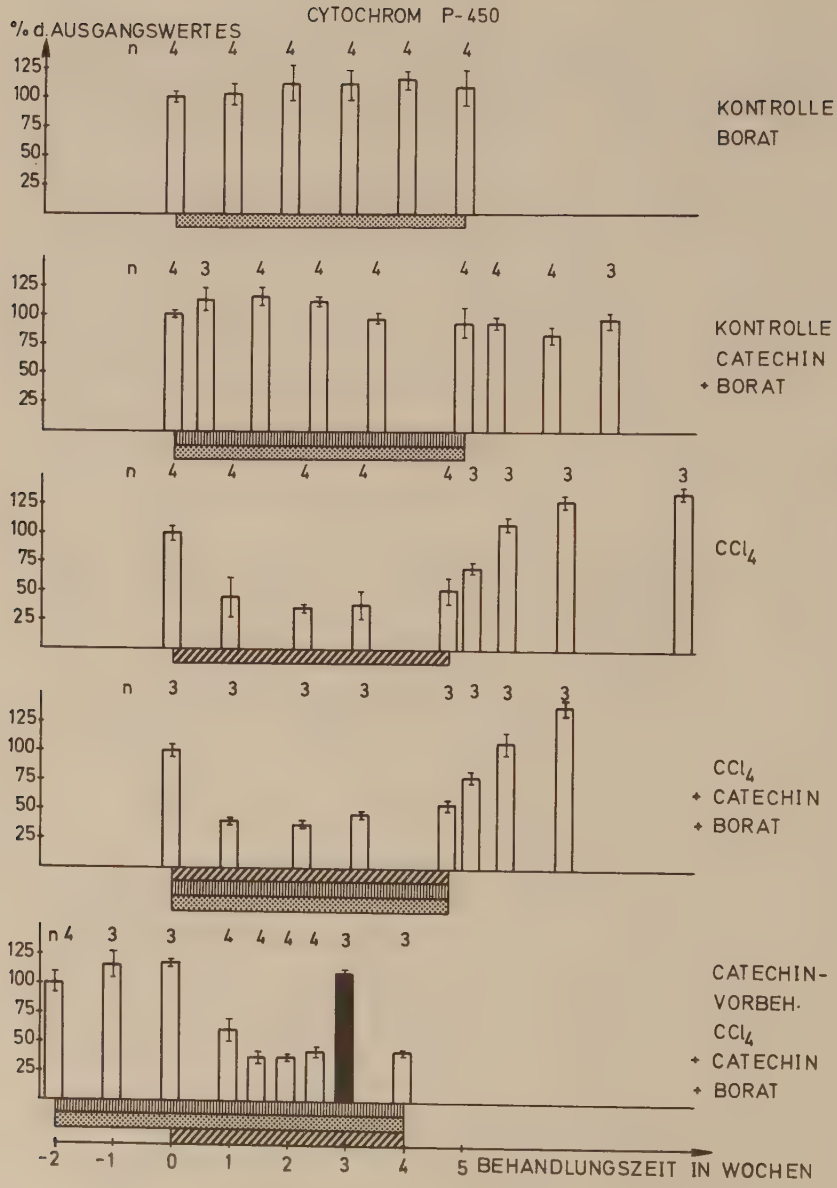
CYTOCHROM P-450
% d. AUSGANGSWERTES
KONTROLLE
BORAT
KONTROLLE
CATECHIN
+ BORAT
CCl4
CCl4
+ CATECHIN
+ BORAT
CATECHIN-
VORBEH.
CCl4
+ CATECHIN
+ BORAT
5 BEHANDLUNGSZEIT IN WOCHEN

Abb. 8

Den raschen und ausgeprägten Abfall des Cytochroms P-450 unter der Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung vermag auch die zusätzliche Applikation von Catechin nicht zu verhindern. Wiederum zeigt sich eine Erholungstendenz schon während der Behandlung, gefolgt von einem raschen Anstieg des Cytochrom P-450-Gehaltes weit über den Ausgangswert nach Absetzen der Behandlung.

Auch nach 2wöchiger Vorbehandlung der Tiere ausschließlich mit Catechin beobachtet man 1-2 Wochen nach Einsetzen der gleichzeitigen Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin einen starken Abfall des Cytochrom P-450-Gehaltes, der nach 2 Wochen mit 30% des Ausgangswertes sein Minimum erreicht. Bereits 1 Woche nach Absetzen der Behandlung tritt eine vollständige Erholung ein.

3.4. Cytochrom b-5

Abbildung 9 veranschaulicht den Verlauf des Cytochrom b-5-Gehaltes der Lebermikrosomen, dargestellt in Prozent des Ausgangswertes (100% entsprechen 0,55nMol Cytochrom b-5/mg mikrosomales Protein), in Abhängigkeit von Art und Dauer der Behandlung.

Der scheinbare Anstieg bis auf 25% des Ausgangswertes unter der Behandlung mit Boratpuffer muß im Rahmen des physiologischen Wachstums der Tiere interpretiert werden.

Die Werte der Catechin-Kontrollserie streuen symmetrisch um den Ausgangswert. Der scheinbare Abfall des Cytochrom b-5-Gehaltes 3 Wochen nach Einsetzen der Catechin-Applikation ist statistisch nicht signifikant ($p \geq 0{,}1$).

Somit haben Catechin und Boratpuffer in den gewählten Dosierungen keinen Einfluß auf den Verlauf des Cytochrom b-5-Gehaltes der Lebermikrosomen.

Abb. 9: Verlauf des Cytochrom b-5-Gehaltes der Lebermikrosomen unter den verschiedenen Behandlungsarten.

= Boratpuffer

= Catechin, gelöst in Boratpuffer

= CCl_4 (Tetrachlorkohlenstoff)

Der Cytochrom b-5-Gehalt (nMol/mg mikrosomales Protein) der Lebermikrosomen vor Behandlungsbeginn wurde als 100% festgelegt.

n = Anzahl der zum entsprechenden Zeitpunkt untersuchten Tiere. Die Standardabweichungen der Meßwerte sind auf den einzelnen Säulen dargestellt. Die schwarz ausgefüllte Säule der untersten Versuchsserie kennzeichnet Meßwerte von Tieren, deren Behandlung 2 Wochen nach Einsetzen der gleichzeitigen Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin abgesetzt wurde.

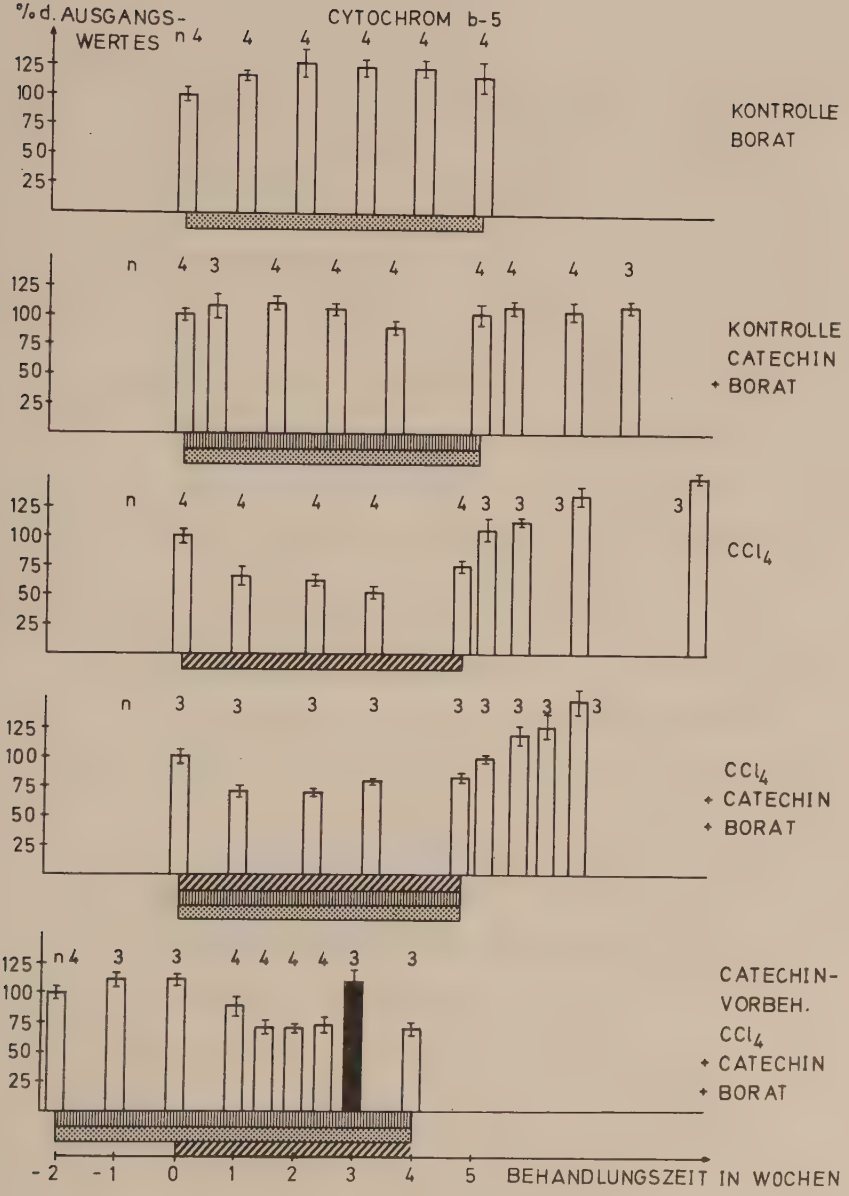
% d. AUSGANGS-WERTES
CYTOCHROM b-5
KONTROLLE
BORAT
KONTROLLE
CATECHIN
+ BORAT
CCl4
CCl4
+ CATECHIN
+ BORAT
CATECHIN-VORBEH.
CCl4
+ CATECHIN
+ BORAT
BEHANDLUNGSZEIT IN WOCHEN

Abb. 9

Der Abfall des Cytochrom b-5-Gehaltes unter alleiniger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff mit einem Minimum von 50% des Ausgangswertes 3 Wochen nach Beginn der Behandlung ist deutlich geringer als derjenige von Cytochrom P-450 (s. unter 3.3.). Qualitativ zeigen jedoch beide Cytochrome denselben Verlauf mit der Tendenz zur Erholung bereits während der Behandlung. Dies trifft auch für den raschen Anstieg beider Cytochrome weit über den Ausgangswert jeweils nach Absetzen der Behandlung zu.

Unter zusätzlicher Gabe von Catechin fällt Cytochrom b-5 nach Einsetzen der Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung nur auf 75% des Ausgangswertes ab. Außerdem zeigt sich unter diesen Behandlungsbedingungen eine noch bessere Erholungstendenz bereits während der Behandlung. Diese Unterschiede sind im Vergleich zur ausschließlichen Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff statistisch signifikant ($p \leq 0{,}01$).

Nach 2wöchiger Catechin-Vorbehandlung zeigt Cytochrom b-5 nach Einsetzen der gleichzeitigen Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin in qualitativer wie in quantitativer Hinsicht keinen unterschiedlichen Verlauf im Vergleich zur Serie mit gleichzeitigem Behandlungsbeginn mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin, sodaß der unter Gabe von Catechin beobachtete "Schutz"-Effekt nicht weiter verbessert werden kann.

3.3. NADPH-Cytochrom c Reduktase

Abbildung 10 zeigt den Verlauf der NADPH Cytochrom c Reduktase-Aktivität der Lebermikrosomen, dargestellt in Prozent des Ausgangswertes (100% entsprechen 1,60nMol reduziertes Cytochrom c/mg mikrosomales Protein/min), in Abhängigkeit von Art und Dauer der Behandlung.

Die Behandlung mit Boratpuffer und Catechin, gelöst in Boratpuffer, zeigt keinen Einfluß auf den Verlauf dieses Flavinenzyms, wie die Kurven der beiden Kontrollserien veranschaulichen.

Unter alleiniger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff zeigt sich ein leichter Abfall der NADPH-Cytochrom c Reduktase-Aktivität ($p \leq 0{,}05$). Eine halbe Woche nach Absetzen der Behandlung wird der Ausgangswert wieder erreicht, es folgt kein weiterer Anstieg des Enzyms.

Unter gleichzeitiger Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin ergibt sich keine Veränderung des Kurvenverlaufes, verglichen mit dem Verlauf des Enzyms unter ausschließlicher Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff.

Auch die Vorbehandlung mit Catechin kann nach Einsetzen der gleichzeitigen Gabe von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin den geringen Abfall der NADPH-Cytochrom c Reduktase-Aktivität nicht verhindern.

Insgesamt scheint die Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung auf die Aktivität der NADPH-Cytochrom c Reduktase keinen wesentlichen Einfluß auszuüben.

Abb. 10: Verlauf der NADPH-Cytochrom c Reduktase der Lebermikrosomen unter den verschiedenen Behandlungsarten.

= Boratpuffer

= Catechin, gelöst in Boratpuffer

= CCl_4 (Tetrachlorkohlenstoff)

Die enzymatische Aktivität der NADPH-Cytochrom c Reduktase (nMol/mg mikrosomales Protein/min) der Lebermikrosomen vor Einsetzen der Behandlung wurde als 100% festgelegt.

n = Anzahl der zum entsprechenden Zeitpunkt untersuchten Tiere. Die Standardabweichungen sind auf den einzelnen Säulen dargestellt.

Die schwarz ausgefüllte Säule der untersten Versuchsserie kennzeichnet Meßwerte von Tieren, deren Behandlung 2 Wochen nach Einsetzen der gleichzeitigen Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin abgesetzt wurde.

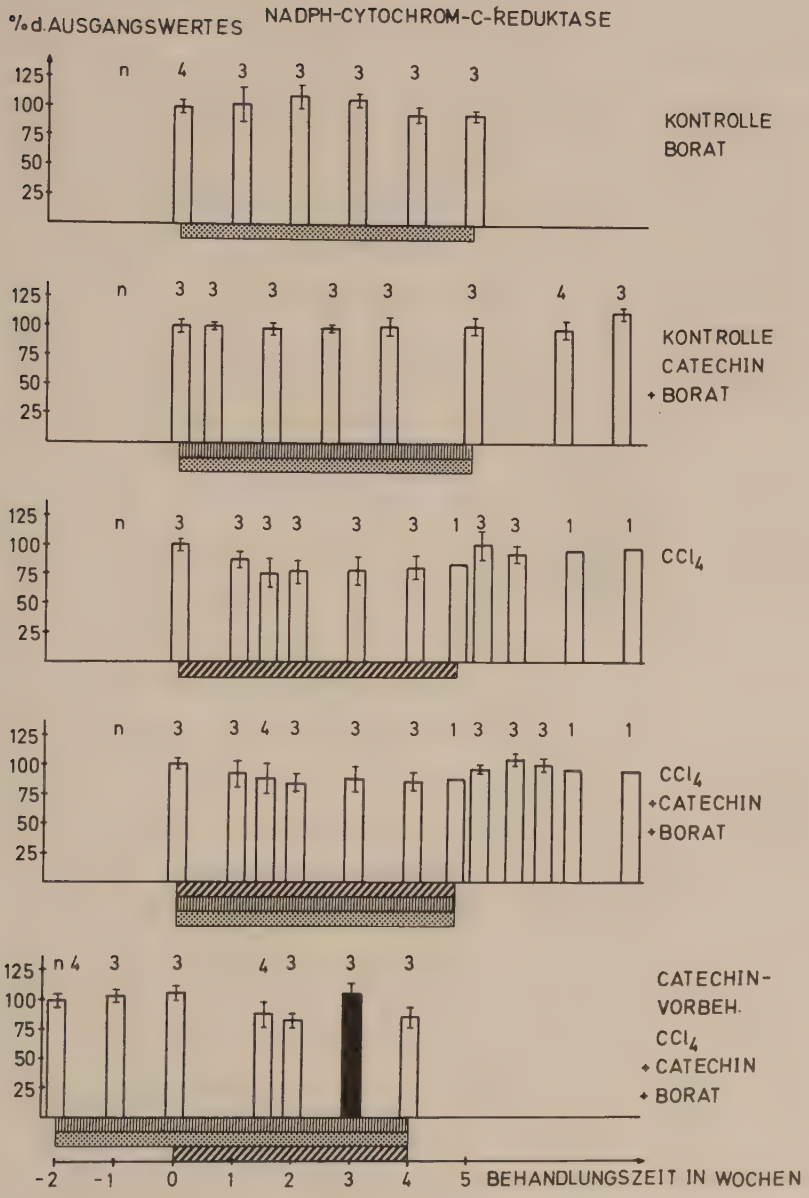
% d. AUSGANGSWERTE
NADPH-CYTOCHROM-C-REDUKTASE
125
100
75
50
25
n 4 3 3 3 3 3
KONTROLLE
BORAT
n 3 3 3 3 3 3 4 3
KONTROLLE
CATECHIN
+ BORAT
n 3 3 3 3 3 3 1 3 3 1 1
CCl4
n 3 3 4 3 3 3 1 3 3 3 1 1
CCl4
+CATECHIN
+BORAT
n 4 3 3 4 3 3 3
CATECHIN-
VORBEH.
CCl4
+CATECHIN
+BORAT
-2 -1 0 1 2 3 4 5 BEHANDLUNGSZEIT IN WOCHEN

Abb. 10

3.6. P-Hydroxylierung von Anilin

Abbildung 11 zeigt die Hydroxylierungsrate von Anilin in Lebermikrosomen, dargestellt in Prozent des Ausgangswertes vor Einsetzen der Behandlung (100% entsprechen 3,6nMol Hydroxyanilin/mg mikrosomales Protein/min), in Abhängigkeit von Art und Dauer der Behandlung.

Abb. 11: Verlauf der p-Hydroxylierungsrate von Anilin in Lebermikrosomen unter den verschiedenen Behandlungsarten.

= Boratpuffer

= Catechin, gelöst in Boratpuffer

= CCl_4 (Tetrachlorkohlenstoff)

Die Hydroxylierungsrate von Anilin (nMol Hydroxyanilin/mg mikrosomales Protein/min) in Lebermikrosomen vor Beginn der Behandlung wurde als 100% festgelegt.

n = Anzahl der zum entsprechenden Zeitpunkt untersuchten Tiere. Die Standardabweichungen der Meßwerte sind auf den einzelnen Säulen dargestellt. Die schwarz ausgefüllte Säule der untersten Versuchsserie kennzeichnet Meßwerte von Tieren, deren Behandlung 2 Wochen nach Einsetzen der gleichzeitigen Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin abgesetzt wurde.

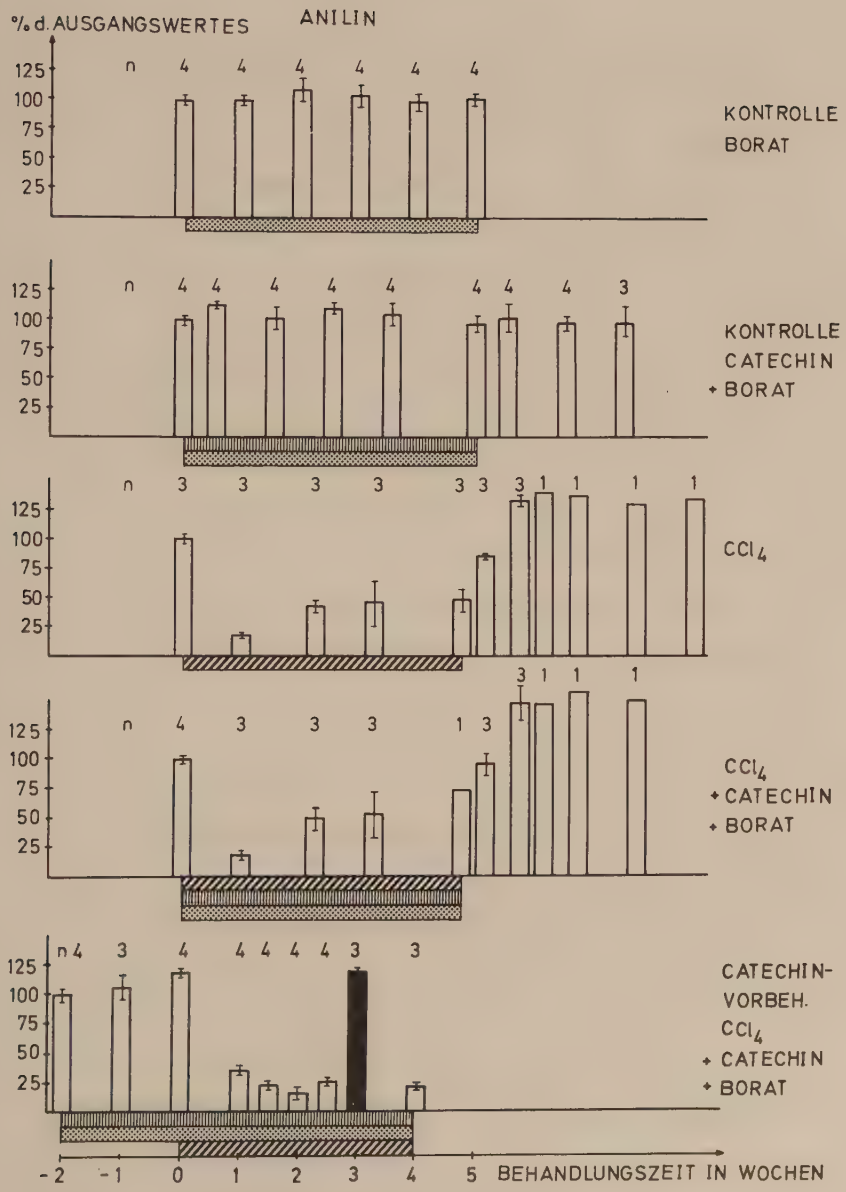
% d. AUSGANGSWERTES
ANILIN
125
100
75
50
25
n 4 4 4 4 4 4
KONTROLLE
BORAT
n 4 4 4 4 4 4 4 4 3
KONTROLLE
CATECHIN
+ BORAT
n 3 3 3 3 3 3 3 1 1 1 1
CCl4
n 4 3 3 3 1 3 3 1 1 1
CCl4
+ CATECHIN
+ BORAT
n 4 3 4 4 4 4 4 3 3
CATECHIN-
VORBEH.
CCl4
+ CATECHIN
+ BORAT
-2 -1 0 1 2 3 4 5 BEHANDLUNGSZEIT IN WOCHEN

Abb. 11

Die Werte der beiden Kontrollserien (Boratpuffer und Catechin, gelöst in Boratpuffer) streuen um den Ausgangswert. Somit zeigen Boratpuffer und Catechin in den gewählten Dosierungen keinen Einfluß auf die Hydroxylierungsrate von Anilin.

Unter ausschließlicher Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff fällt die Hydroxylierungsrate bereits nach 1 Woche Behandlungsdauer mit 20% des Ausgangswertes auf ihr Minimum ab, gefolgt von einem Anstieg auf ca. 50% des Ausgangswertes 2 Wochen nach Einsetzen der Behandlung. Dieser Wert bleibt im Verlauf der weiteren Behandlung konstant. Schon 3 Tage nach Absetzen der Behandlung zeigt sich eine nahezu vollständige Erholung auf den Ausgangswert, der 1 Woche nach Absetzen der Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff bereits um 25% überschritten wird.

Die gleichzeitige Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin kann zwar den Abfall der Hydroxylierungsrate von Anilin nicht verhindern, es zeigt sich jedoch eine bessere Erholungstendenz im Verlauf der weiteren Behandlung, verglichen mit der ausschließlichen Applikation von Tetrachlorkohlenstoff.

Nach der Catechin-Vorbehandlung fällt die Hydroxylierungsrate von Anilin mit Einsetzen der gleichzeitigen Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin noch stärker ab als bei gleichzeitigem Behandlungs-

beginn mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin; außerdem zeigt sich keine Erholungstendenz während der Behandlung.

Somit erweist sich Catechin als ineffektiv hinsichtlich der Hemmbarkeit des Abfalls der Hydroxylierungsrate von Anilin unter der Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff.

3.7. O-Demethylierung von p-Nitro-Anisol

Abbildung 12 zeigt als weiteren Stoffwechselparameter die Metabolisierungsrate von p-Nitro-Anisol in Lebermikrosomen, dargestellt in Prozent des Ausgangswertes (100% entsprechen 6,75nMol p-Nitro-Phenol/mg mikrosomales Protein/min), in Abhängigkeit von Art und Dauer der Behandlung.

Die Werte der beiden Kontrollserien (Boratpuffer und Catechin, gelöst in Boratpuffer) streuen symmetrisch um den Ausgangswert. Der unter der Behandlung mit Catechin 1 Woche nach Behandlungsbeginn beobachtete Abfall der Metabolisierungsrate von p-Nitro-Anisol kann nicht erklärt werden. Es ist nicht auszuschließen, daß es sich um einen Meßfehler handelt. Somit dürften Catechin und Boratpuffer in den gewählten Dosierungen keinen Einfluß auf die Metabolisierungsrate von p-Nitro-Anisol haben.

Unter Applikation von Tetrachlorkohlenstoff erfolgt bereits 1 Woche nach Behandlungsbeginn ein Abfall der

Metabolisierungsrate auf ca. 50% des Ausgangswertes. Jedoch zeigt sich noch im Verlauf der weiteren Behandlung eine vollständige Erholung auf den Ausgangswert. Nach Absetzen der Behandlung erfolgt kein weiterer Anstieg der Metabolisierungsrate.

Abb. 12: Verlauf der O-Demethylierungsrate von p-Nitro-Anisol in Lebermikrosomen unter den verschiedenen Behandlungsarten.

= Boratpuffer

= Catechin, gelöst in Boratpuffer

= CCl_4 (Tetrachlorkohlenstoff)

Die O-Demethylierungsrate von p-Nitro-Anisol (nMol p-Nitro-Anisol/mg mikrosomales Protein/min) in Lebermikrosomen vor Beginn der Behandlung wurde als 100% festgelegt.

n = Anzahl der zum entsprechenden Zeitpunkt untersuchten Tiere. Die Standardabweichungen der Meßwerte sind auf den einzelnen Säulen dargestellt. Die schwarz ausgefüllten Säulen der untersten Versuchsserie kennzeichnen Meßwerte von Tieren, deren Behandlung 2 Wochen nach Einsetzen der gleichzeitigen Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin abgesetzt wurde.

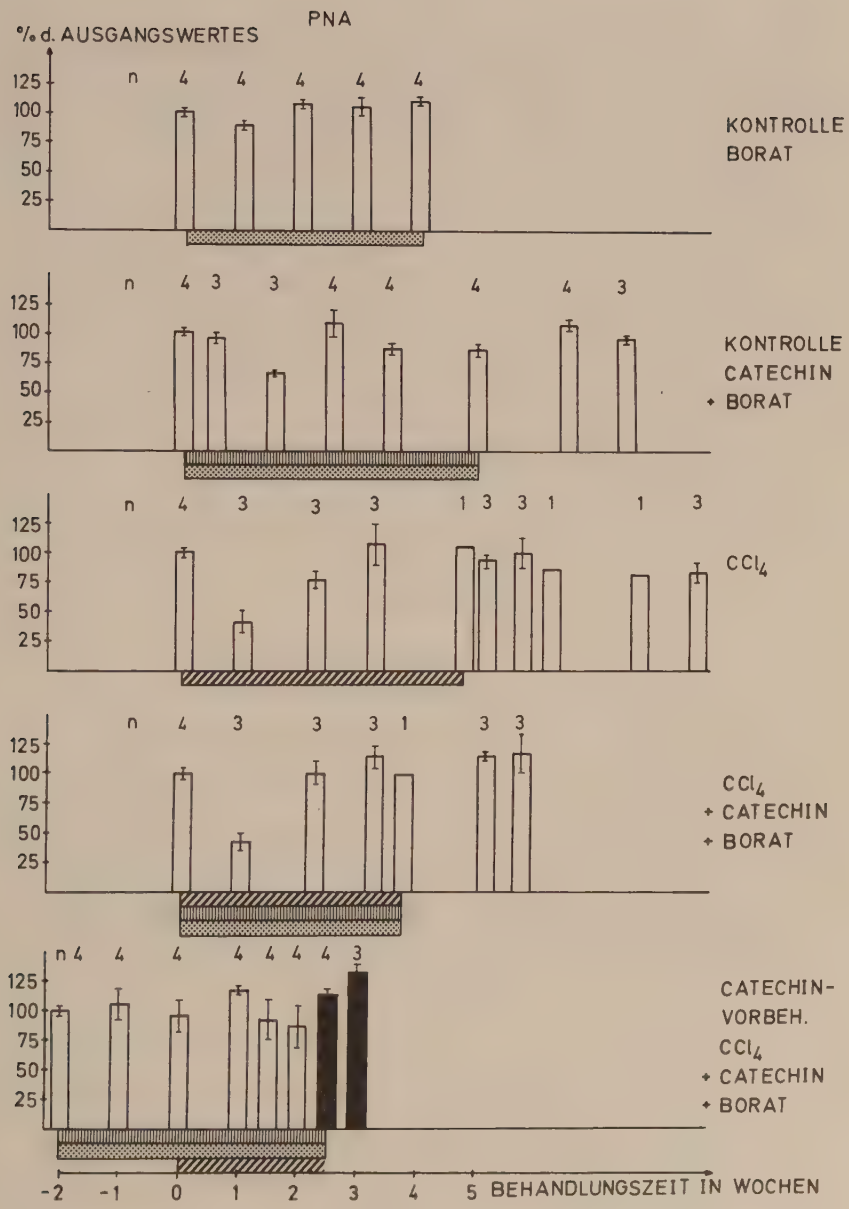
PNA
% d. AUSGANGSWERTES
125
100
75
50
25
n 4 4 4 4 4
KONTROLLE
BORAT
n 4 3 3 4 4 4 4 3
KONTROLLE
CATECHIN
+ BORAT
n 4 3 3 3 1 3 3 1 1 3
CCl4
n 4 3 3 3 1 3 3
CCl4
+ CATECHIN
+ BORAT
n 4 4 4 4 4 4 4 3
CATECHIN-
VORBEH.
CCl4
+ CATECHIN
+ BORAT
-2 -1 0 1 2 3 4 5 BEHANDLUNGSZEIT IN WOCHEN

Abb. 12

Die zusätzliche Gabe von Catechin kann den unter der Applikation von Tetrachlorkohlenstoff auftretenden initialen Abfall der Metabolisierungsrate nicht verhindern; sie scheint jedoch die Erholung zu beschleunigen.

Nach Vorbehandlung der Tiere mit Catechin bleibt der Abfall der Metabolisierungsrate von p-Nitro-Anisol bei Einsetzen der gleichzeitigen Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin auf ca. 80-90% des Ausgangswertes beschränkt.

Somit zeigt Catechin einen "Schutz"-Effekt hinsichtlich des unter Tetrachlorkohlenstoff-Applikation auftretenden Abfalls der Metabolisierungsrate von p-Nitro-Anisol. Dieser "Schutz"-Effekt kann durch 2wöchige Vorbehandlung der Tiere mit Catechin vor Einsetzen der gleichzeitigen Applikation von Tetrachlorkohlenstoff und Catechin noch weiter verbessert werden. Damit ist die O-Demethylierung der einzige Parameter der Fremdstoff-Hydroxylierungs-Aktivität, auf den Catechin unter Tetrachlorkohlenstoff-Applikation einen "Schutz"-Effekt ausübt.

3.8. Ergebnisse der histologischen Untersuchung

Die folgenden Abbildungen zeigen anhand der vier gewählten Färbungen, Hämatoxilin-Eosin (HE), Periodic-acid-Schiff-reaction (PAS-Reaktion), Trichrom nach MASSON in der Modifikation von GOLDNER und Silberimprägnation nach LENDRUM schwerpunktartig die wesentlichen histologischen Veränderungen der Rattenleber unter den verschiedenen Arten der Behandlung (Behandlungsserie 1-4). Aus jeder Behandlungsserie wurden charakteristische, für die gesamte Serie repräsentative Abbildungen ausgewählt. Einige Abbildungen unbehandelter Kontrolltiere sollen zum Vergleich zu den unter den verschiedenen Behandlungsarten auftretenden Veränderungen diesem Abschnitt vorangestellt werden.

Die Abbildungen 13-16 zeigen die Leberstruktur unbehandelter Kontrolltiere. In allen Abbildungen stellt sich eine normale Läppchenstruktur mit vollständiger Integrität von Leberzellen und Zellbalken dar, es finden sich keine Infiltrationen, keine Ablagerungen von Pigmenten oder anderen Substanzen, unauffällige Sinusoide.
Abbildung 14 zeigt einen normalen Glykogengehalt der Leberzellen. Bemerkenswert ist die zentrilobulär betonte Verteilung des Glykogens. In Abbildung 16 stellen sich die retikulären Fasern der Sinusoide in regelrechter Art und Menge dar.

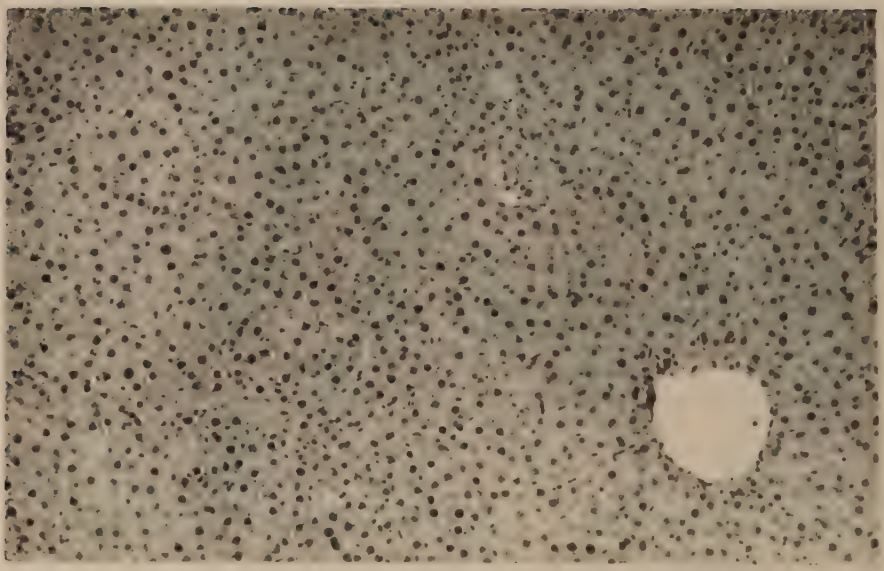

Abb. 13: unbehandelte Kontrolle, HE, Vergr. 100x

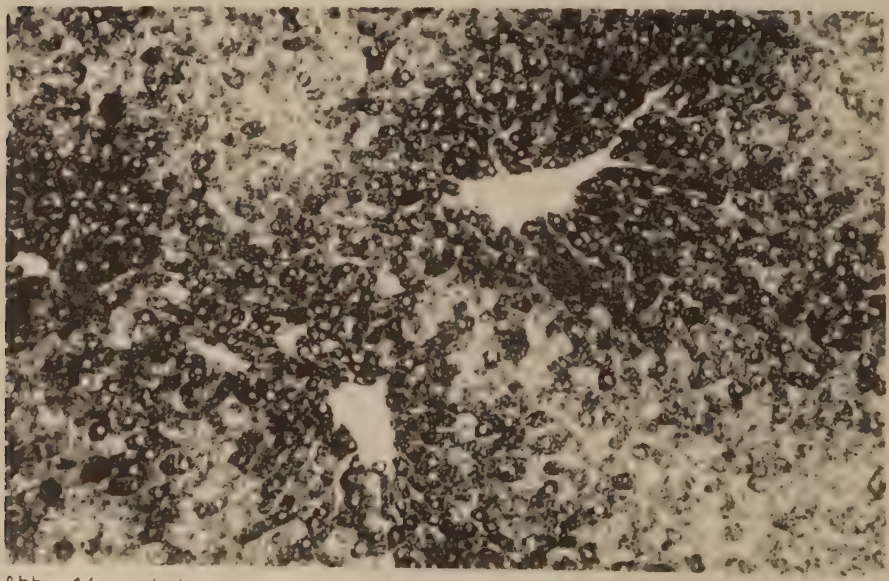

Abb. 14: unbehandelte Kontrolle, PAS, Vergr. 100x

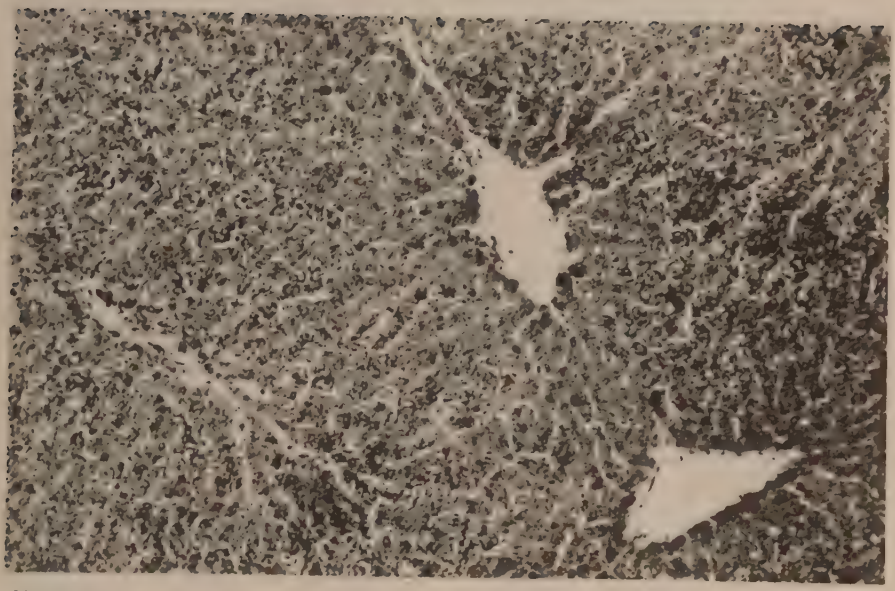

Abb. 15: unbehandelte Kontrolle, Trichrom nach MASSON-GOLDNER, Vergr. 100x

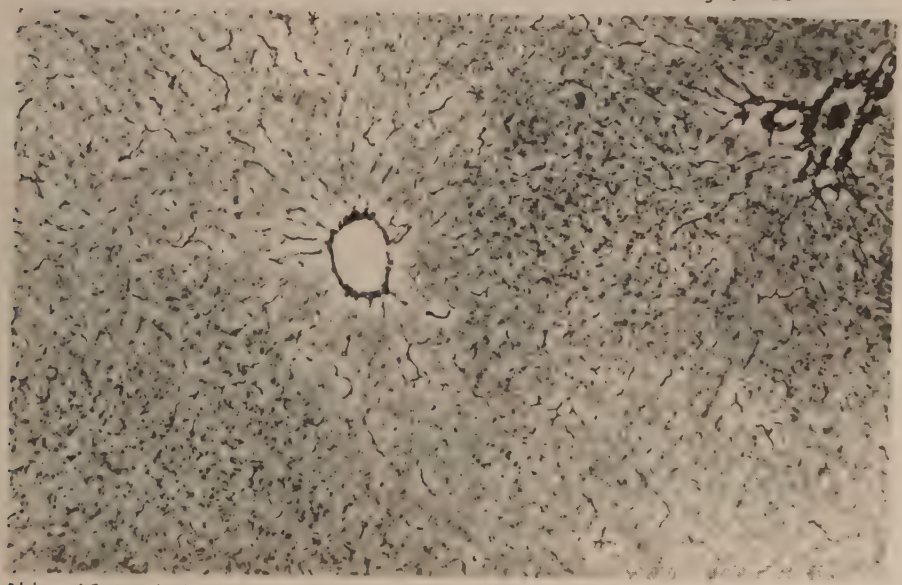

Abb. 16: unbehandelte Kontrolle, Silberimprägnation nach LENDRUM, Vergr. 100x

Die Abbildungen 17-20 zeigen die feingewebliche Struktur nach 5wöchiger Behandlung ausschließlich mit Boratpuffer.
Man erkennt wiederum eine völlig normale Läppchenstruktur, ein unauffälliges regelmäßiges Zellbild ohne Infiltrationen, keine Schwellung oder Vakuolisierung der Zellen, keine Zeichen der Regeneration, keine Ablagerung von Pigmenten oder anderen Substanzen.

Abbildung 18 zeigt einen normalen Glykogengehalt der Leberzellen, Abbildung 20 einen unauffälligen Gehalt der Sinusoide an retikulären Fasern.
Im Vergleich mit den Abbildungen der unbehandelten Kontrollen ergeben sich keinerlei lichtmikroskopisch faßbare strukturelle Veränderungen. Somit hat der Boratpuffer in der gewählten Dosierung keinen Einfluß auf die unter den gegebenen Voraussetzungen überschaubaren feingeweblichen Strukturen der Rattenleber.

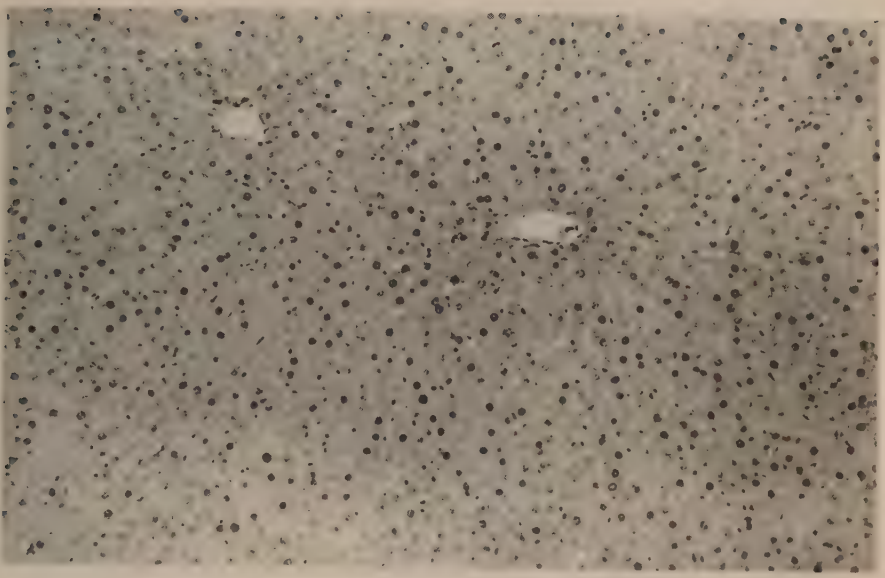

Abb. 17: Boratpuffer 5 Wochen, HE, Vergr. 100x

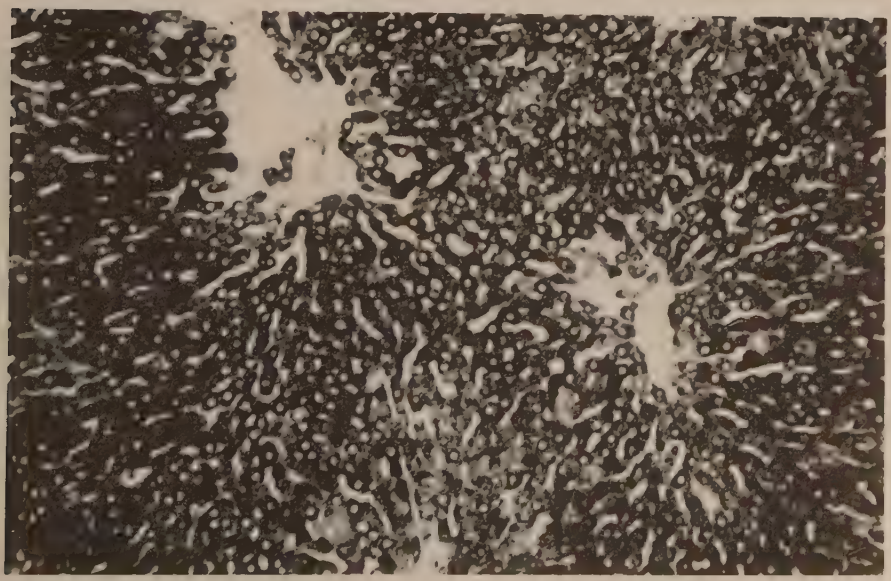

Abb. 18: Boratpuffer 5 Wochen, PAS, Vergr. 125x

Abb. 19: Boratpuffer 5 Wochen, Trichrom nach MASSON-GOLDNER, Vergr. 100x

Abb. 20: Boratpuffer 5 Wochen, Silberimprägnation nach LENDRUM, Vergr. 100x

Die Abbildungen 21-24 stellen die Struktur der Rattenleber nach 5wöchiger Behandlung mit Catechin, gelöst in Boratpuffer, dar.

Auch diese Abbildungen zeigen eine normale Läppchenstruktur mit vollständiger Integrität von Zellen und Zellbalken, keine Infiltrationen, keine Zeichen der Regeneration.
In Abbildung 22 stellt sich ein noch normaler Glykogengehalt der Leberzellen dar, Abbildung 24 zeigt die retikulären Fasern der sinusoidalen Räume in unauffälliger Art und Menge.

Der Vergleich mit den Abbildungen der unbehandelten Kontrollen zeigt somit die Einflußlosigkeit von Catechin, gelöst in Boratpuffer, auf die unter den gewählten Bedingungen kontrollierbaren histologischen Strukturen der Rattenleber.

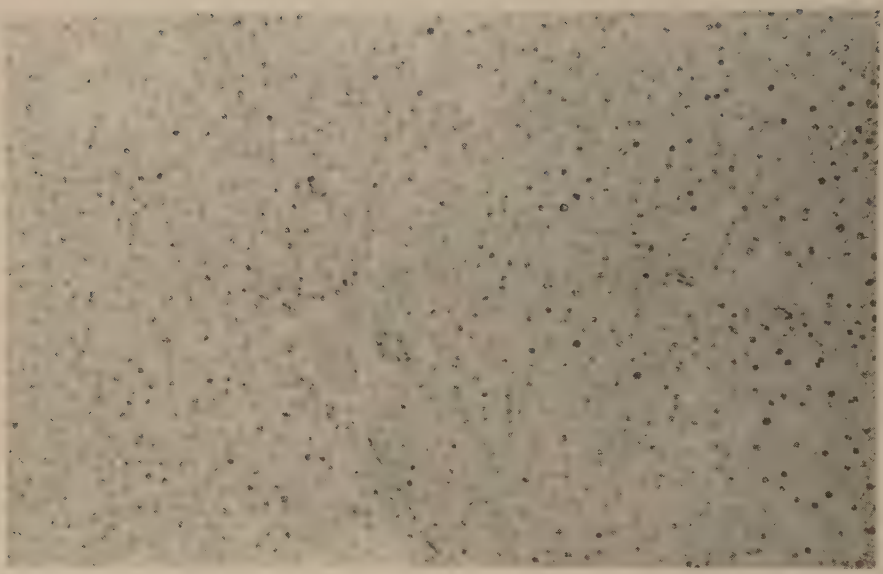

Abb. 21: Catechin, gelöst in Boratpuffer, 5 Wochen, HE, Vergr. 100x

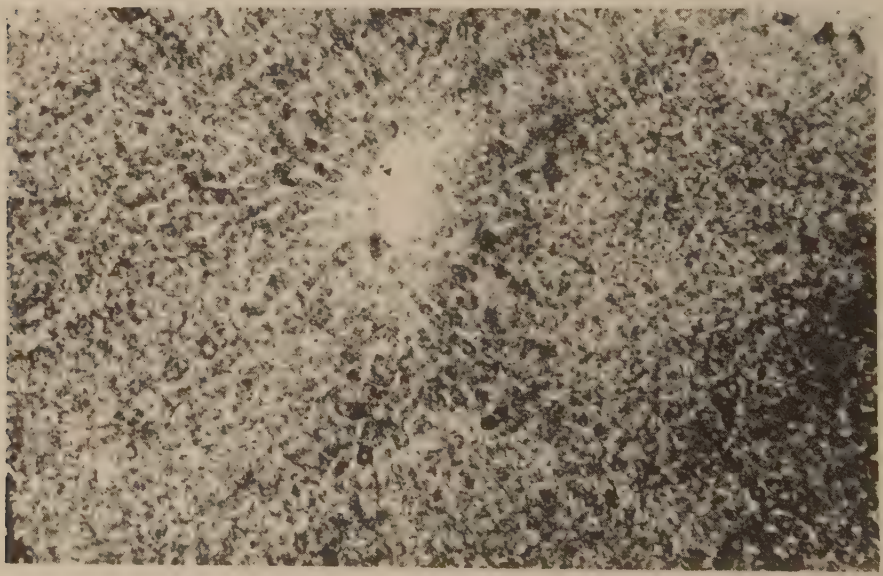

Abb. 22: Catechin, gelöst in Boratpuffer, 5 Wochen, PAS, Vergr. 100x

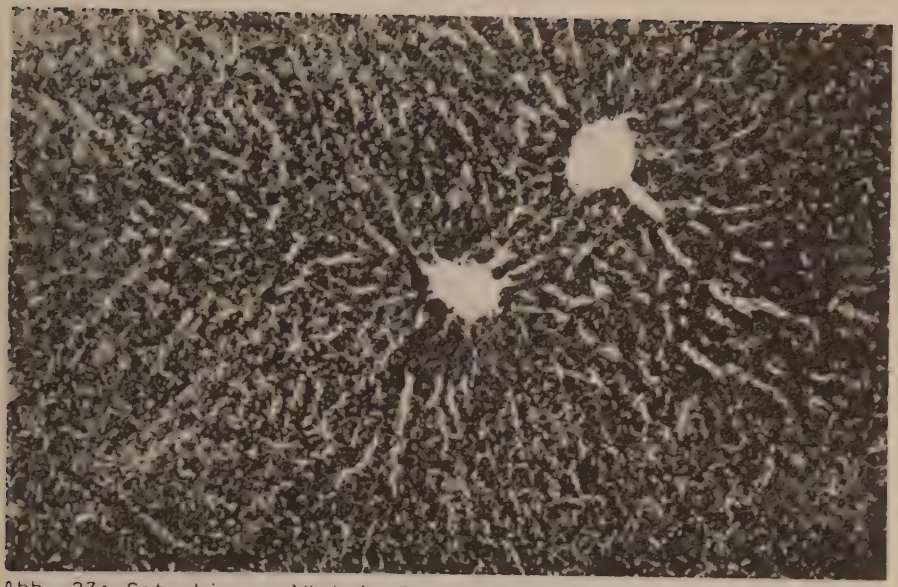

Abb. 23: Catechin, gelöst in Boratpuffer, 5 Wochen, Trichrom nach MASSON-GOLDNER, Vergr. 100x

Abb. 24: Catechin, gelöst in Boratpuffer, 5 Wochen, Silberimprägnation nach LENDRUM, Vergr. 100x

Die Abbildungen 25 und 26 zeigen in der HE-Färbung die Veränderungen der Leberstruktur nach 3 1/2wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff (Abb. 25) und ebenfalls 3 1/2wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig (Abb. 26).

In Abbildung 25 erkennt man eine massive Störung der Integrität der Leberzellen und der Zellbalken, es findet sich eine starke lymphohistiocytäre Infiltration, die Kupfferschen Sternzellen sind vermehrt und geschwollen, ebenso findet man eine Schwellung der Leberzellen mit Verengung der sinusoidalen Räume; außerdem erkennt man eine mittelgradige Verfettung, ferner einzelne Gallengangshyperregenerate, die auf eine Cholestase hindeuten könnten. Ferner sind Zeichen der Regeneration (Mitosen, Doppelkerne), ein deutliches Hervortreten der Nukleoli und eine blasige Vakuolisierung der Zellkerne zu erkennen.

Auch in Abb. 26 ist eine Störung des Zellbildes im Sinne einer hydropischen Schwellung der Leberzellen mit Verschmälerung der sinusoidalen Räume zu erkennen, ferner lymphohistiocytäre Infiltrationen, Vermehrung der Kupfferschen Sternzellen, Zeichen der Regeneration, eine massive großtropfige Verfettung, ein deutliches Hervortreten der Nukleoli bei blasiger Vakuolisierung der Zellkerne.

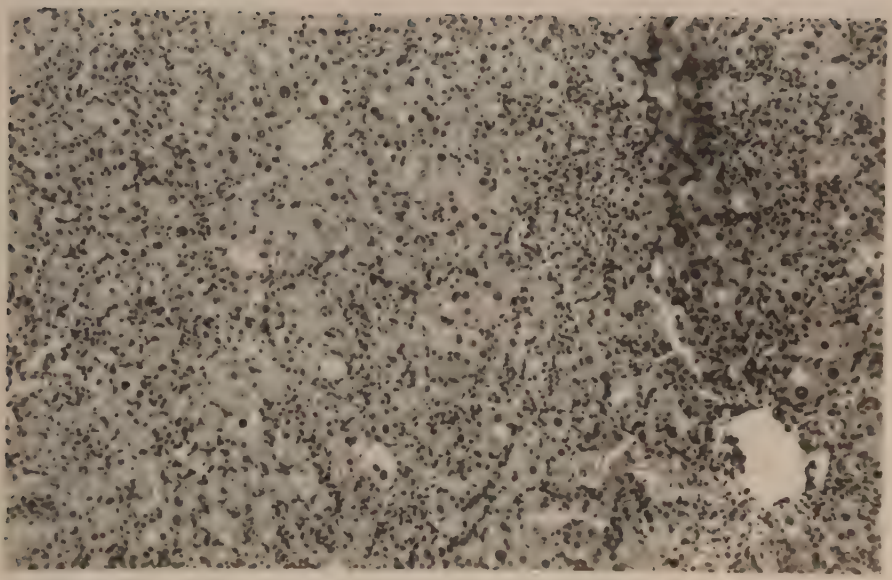

Abb. 25: Tetrachlorkohlenstoff 3 1/2 Wochen, HE, Vergr. 100x

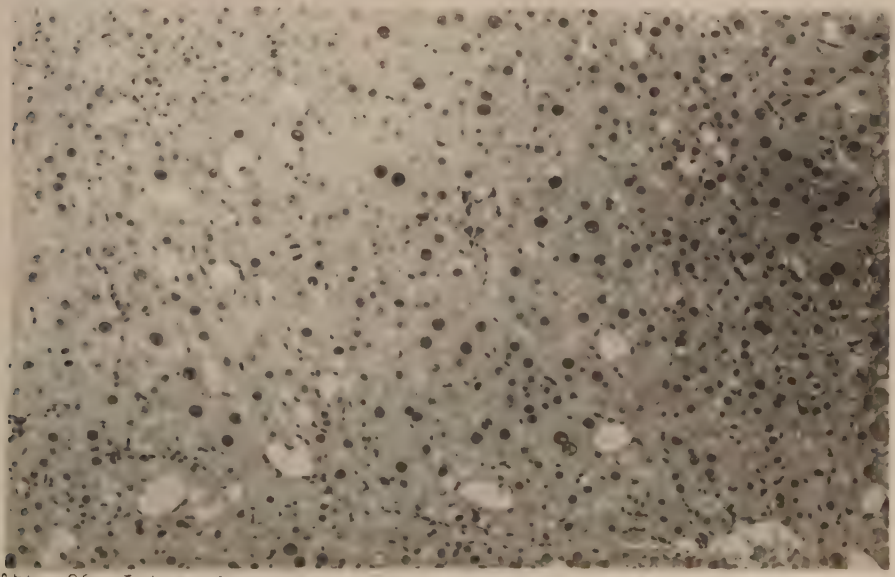

Abb. 26: Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig 3 1/2 Wochen, HE, Vergr. 100x

Der Vergleich der beiden Abbildungen 25 und 26 untereinander zeigt, daß die Veränderungen zwar in qualitativer Hinsicht ähnlich sind, jedoch hinsichtlich der Quantität von erheblichem Unterschied. Während in Abbildung 26 lediglich die Verfettung etwas ausgeprägter ist als in Abbildung 25, sind alle übrigen oben beschriebenen Veränderungen, insbesondere die lymphohistiocytäre Infiltration und die Vermehrung und Schwellung der Kupfferschen Sternzellen, in Abbildung 25 wesentlich ausgeprägter als in Abbildung 26. Die zusätzliche Gabe von Catechin zur Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff zeigt somit einen deutlichen "Schutz"-Effekt vor den durch Tetrachlorkohlenstoff induzierten strukturellen Veränderungen.

Die Abbildungen 27 und 28 zeigen in der PAS-Reaktion den Glykogengehalt der Leberzellen nach 3 1/2wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff (Abb. 27) und 3 1/2wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig (Abb. 28).

Während in Abbildung 27 unter alleiniger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff eine nahezu vollständige Glykogenentspeicherung, insbesondere zentrilobulär, zu erkennen ist - es sind nur noch einzelne Granula vorhanden - findet sich in Abbildung 28 unter zusätzlicher Behandlung mit Catechin lediglich eine zentrilobuläre Entspeicherung.

Abb. 27: Tetrachlorkohlenstoff 3 1/2 Wochen, PAS, Vergr. 100x

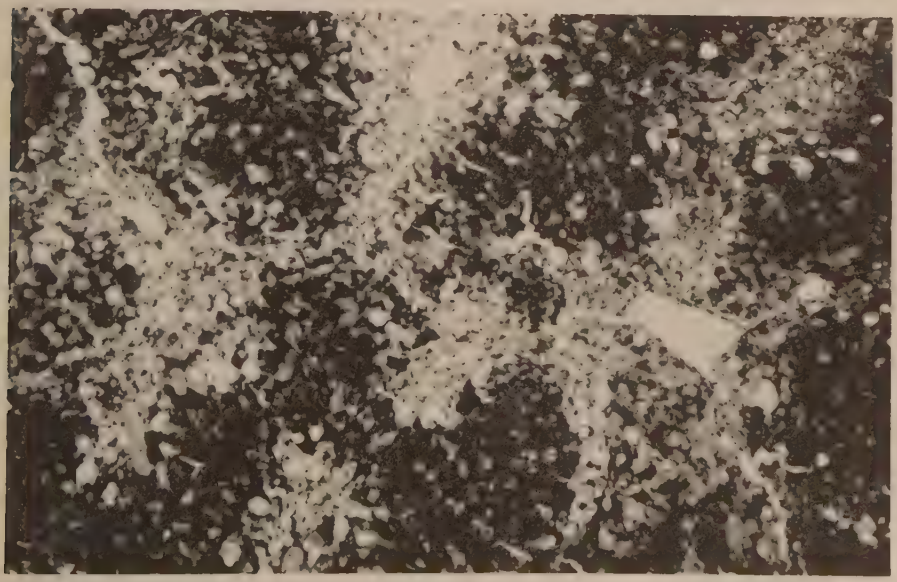

Abb. 28: Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig
3 1/2 Wochen, PAS, Vergr. 100x

Catechin zeigt somit einen deutlichen "Schutz"-Effekt gegenüber der durch Tetrachlorkohlenstoff bedingten Glykogenentspeicherung der Leberzellen.

In den Abbildungen 29 und 30 sind in der Trichromfärbung nach MASSON-GOLDNER die histologischen Veränderungen nach 3 1/2wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff (Abb. 29) und 3 1/2wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig (Abb. 30) dargestellt.

Der Vergleich der beiden Abbildungen 29 und 30 zeigt wiederum eine erheblich stärkere Strukturschädigung der Leber mit massiven lymphohistiocytären Infiltrationen, hydropischer Schwellung der Leberzellen, Zeichen der Regeneration, Hervortreten der Nukleoli, blasiger Vakuolisierung der Zellkerne, Schwellung und Vermehrung der Kupfferschen Sternzellen, unter alleiniger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff (Abb. 29). Die zusätzliche Behandlung mit Catechin zeigt somit wiederum einen deutlichen "Schutz"-Effekt gegenüber den durch Tetrachlorkohlenstoff bedingten histologischen Veränderungen.

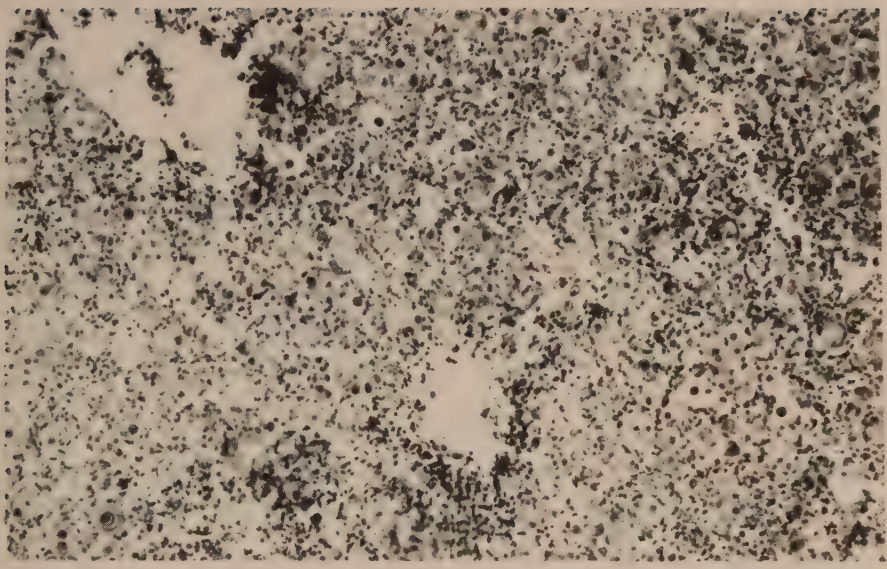

Abb. 29: Tetrachlorkohlenstoff 3 1/2 Wochen, Trichrom nach MASSON-GOLDNER, Vergr. 100x

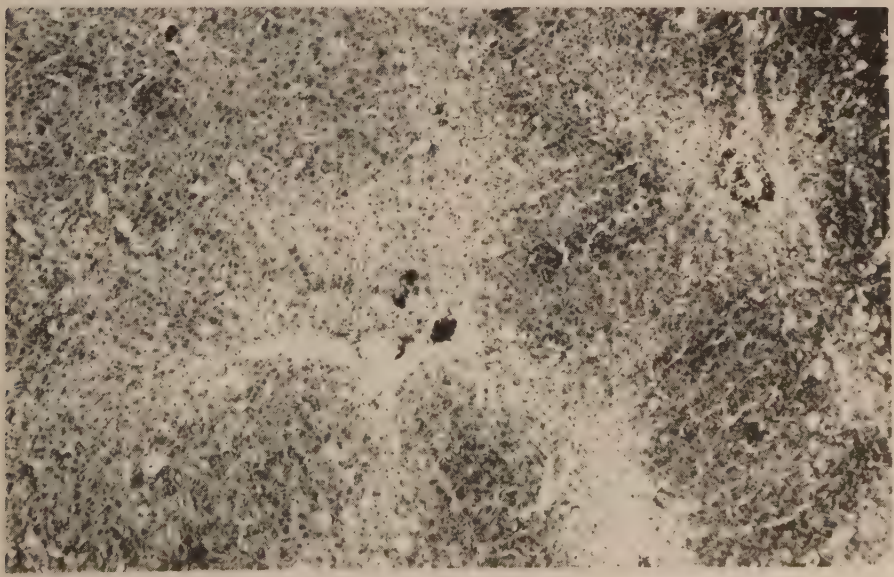

Abb. 30: Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig 3 1/2 Wochen, Trichrom nach MASSON-GOLDNER, Vergr. 100x

Die Abbildungen 31 und 32 zeigen in der Silberimprägnation nach LENDRUM den Fasergehalt der sinusoidalen Räume der Leber nach 3 1/2wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff (Abb. 31) und 3 1/2wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig (Abb. 32).

Unter der gleichzeitigen Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin (Abb. 32) erkennt man im Vergleich zur entsprechenden Abbildung der unbehandelten Kontrollen (Abb. 16) eine nur geringe Zunahme des retikulären Bindegewebes.
Dagegen beobachtet man eine massive Zunahme der Gitterfasern unter alleiniger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff (Abb. 31). Damit zeigt Catechin auch hinsichtlich dieses Parameters einen deutlichen "Schutz"-Effekt vor den durch Tetrachlorkohlenstoff induzierten Veränderungen.

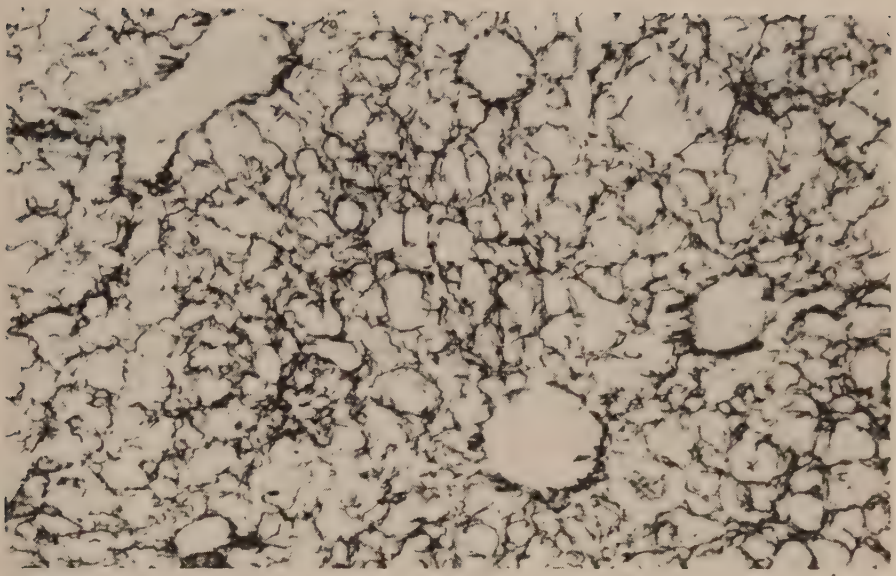

Abb. 31: Tetrachlorkohlenstoff 3 1/2 Wochen, Silberimprägnation nach LENDRUM, Vergr. 125x

Abb. 32: Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig 3 1/2 Wochen, Silberimprägnation nach LENDRUM, Vergr. 100x

Die Abbildungen 33 und 34 zeigen in der HE-Färbung die Leberstruktur nach 5wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff (Abb. 33) und 5wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig (Abb. 34).

Im Vergleich mit Abbildung 25 zeigt die Abbildung 33 eine Zunahme der großtropfigen Verfettung. Ansonsten findet man in Abbildung 33 wie in Abbildung 25 massive lymphohistiocytäre Infiltrate, eine Schwellung der Leberzellen mit Verschmälerung der sinusoidalen Räume, Vermehrung und Schwellung der Kupfferschen Sternzellen, ein deutliches Hervortreten der Nukleoli, blasige Vakuolisierung der Zellkerne und Zeichen der Regeneration (Mitosen, Doppelkerne). Insgesamt handelt es sich in Abbildung 33 also um einen ähnlichen Schweregrad der histologischen Veränderungen wie in Abbildung 25.

Abbildung 34 zeigt im Vergleich mit Abbildung 26 ebenfalls eine Zunahme der großtropfigen Verfettung, ansonsten in qualitativer wie in quantitativer Hinsicht dieselben Veränderungen, die bereits bei Abbildung 26 beschrieben wurden.

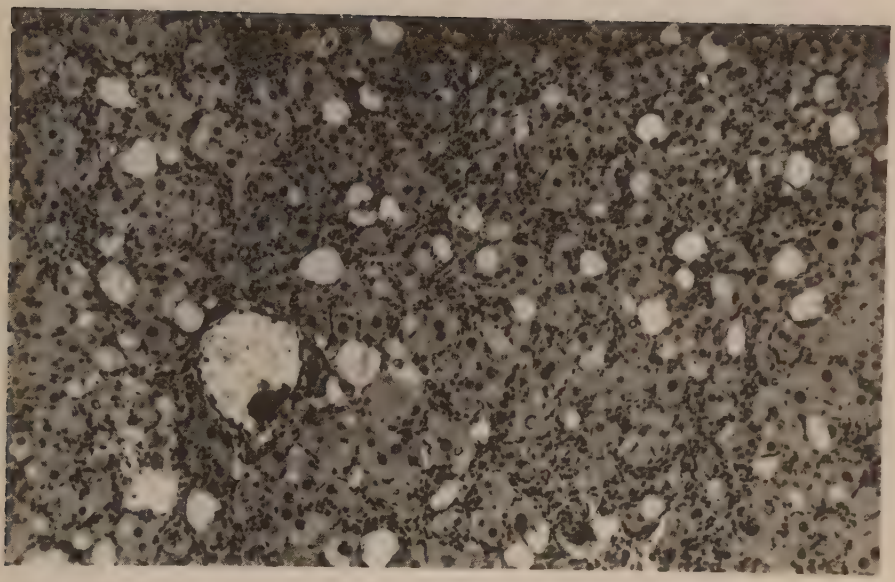

Abb. 33: Tetrachlorkohlenstoff 5 Wochen, HE, Vergr. 100x

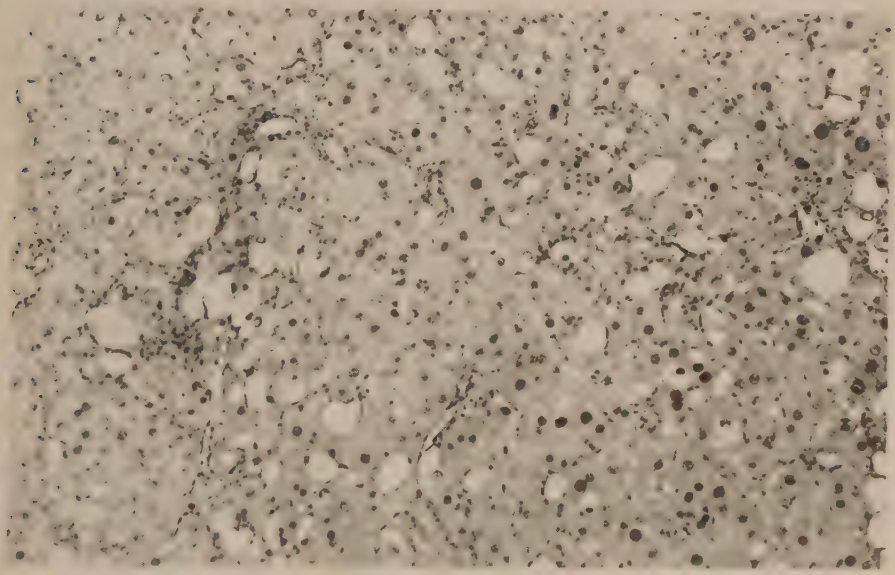

Abb. 34: Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig 5 Wochen, HE, Vergr. 100x

Vergleicht man die Abbildungen 33 und 34 miteinander, so stellt man wiederum - ähnlich wie beim Vergleich der Abbildungen 25 und 26 - fest, daß die Veränderungen in beiden Bildern zwar in qualitativer Hinsicht ähnlich sind, sich jedoch hinsichtlich der Quantität erheblich voneinander unterscheiden, d.h., daß unter alleiniger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff sämtliche beschriebenen Veränderungen mit Ausnahme der Verfettung wesentlich schwerer sind als unter gleichzeitiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin.
Die zusätzliche Behandlung mit Catechin führt also auch nach 5wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff zu einem bedeutenden "Schutz"-Effekt gegenüber den durch Tetrachlorkohlenstoff ausgelösten Veränderungen, der in seinem Ausmaß demjenigen nach 3 1/2wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff bzw. Tetrachlorkohlenstoff und Catechin (Abbildungen 25 und 26) entspricht.

Die Abbildungen 35 und 36 zeigen in der PAS-Reaktion den Glykogengehalt der Leberzellen nach 5wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff (Abb. 35) und 5wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig (Abb. 36).
Wie nach 3 1/2wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff (Abb. 27) zeigt sich auch nach 5wöchiger Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung (Abb. 35) ein weitgehender,

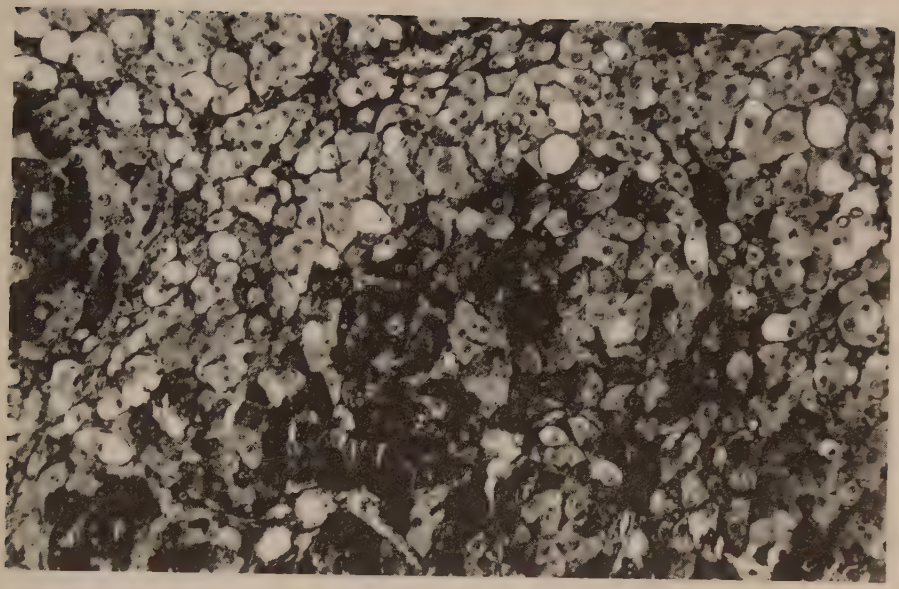

Abb. 35: Tetrachlorkohlenstoff 5 Wochen, PAS-Reaktion, Vergr. 125x

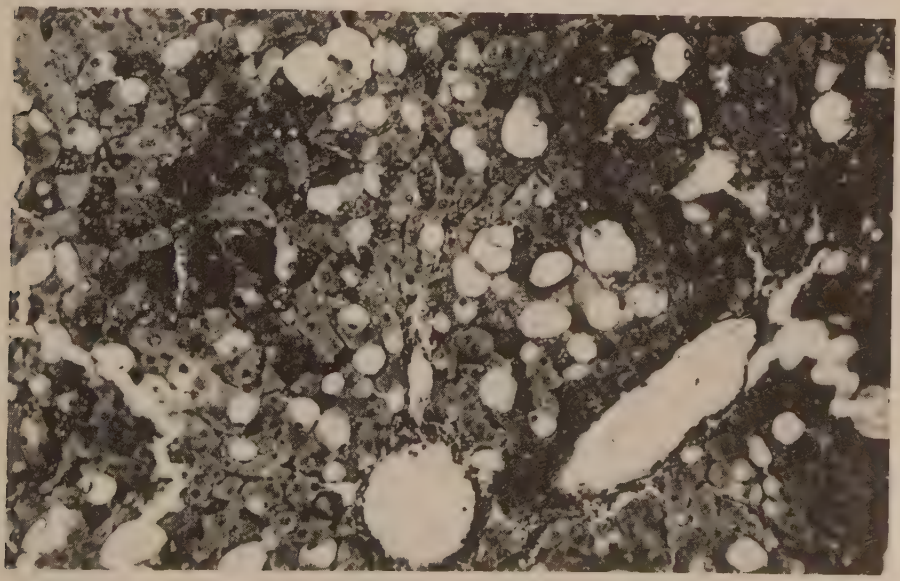

Abb. 36: Tetrachlorkohlenstoff und Catechin 5 Wochen, PAS-Reaktion, Vergr. 125x

insbesondere zentrilobulärer Glykogenschwund. Bemerkenswert ist, daß v.a. die Zellregenerate keine Glykogenspeicherung aufweisen. Dasselbe Glykogendefizit zeigt sich nach 5wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig (Abb. 36), während nach 3 1/2wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig (Abb. 28) lediglich ein centrilobulärer Glykogenschwund festzustellen war.

In den Abbildungen 37 und 38 werden in der Trichromfärbung nach MASSON-GOLDNER die histologischen Veränderungen nach 5wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff (Abb. 37) und nach 5wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig (Abb. 38) dargestellt.

Auch hier werden die erheblich schwereren Strukturveränderungen unter alleiniger Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung (Abb. 37) gegenüber der gleichzeitigen Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin (Abb. 38) deutlich. Im Vergleich mit den Abbildungen 29 und 30 zeigt sich in den Abbildungen 37 und 38 unter beiden Behandlungsbedingungen eine gleichsinnige Zunahme der Verfettung, die unter zusätzlicher Catechinbehandlung eher noch größer zu sein scheint.

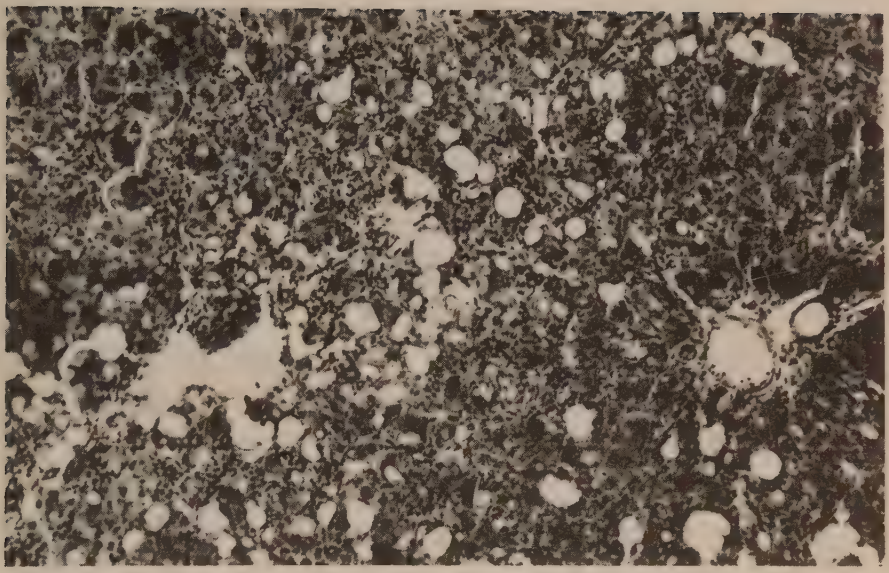

Abb. 37: Tetrachlorkohlenstoff 5 Wochen, Trichrom nach MASSON-GOLDNER, Vergr. 100x

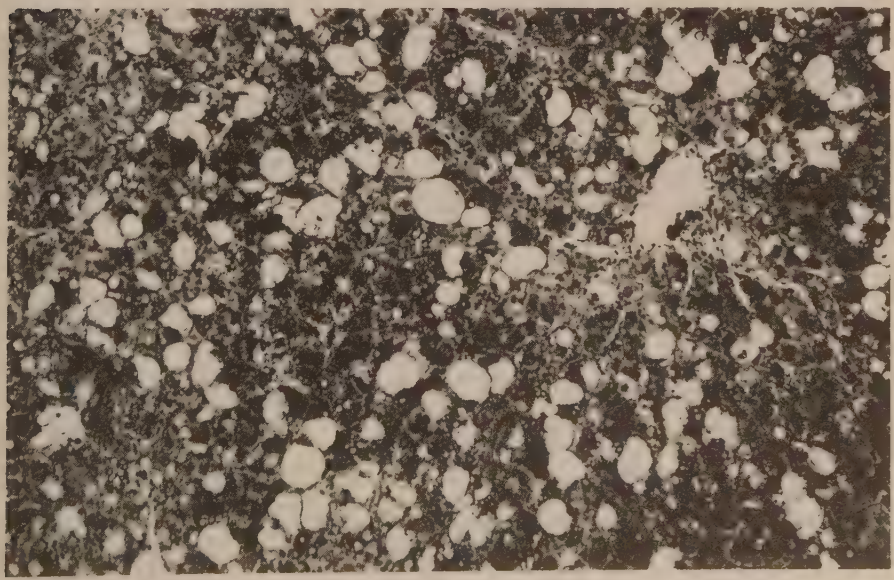

Abb. 38: Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig 5 Wochen, Trichrom nach MASSON-GOLDNER, Vergr. 100x

Insgesamt wird jedoch deutlich, daß durch die zusätzliche Behandlung mit Catechin der "Schutz"-Effekt, der nach 3 1/2wöchiger Behandlung zu beobachten war (Abb. 30), auch nach 5wöchiger Behandlung bestehen bleibt.

In den Abbildungen 39 und 40 wird mit Hilfe der Silberimprägnation nach LENDRUM der Gehalt der sinusoidalen Räume an retikulären Fasern nach 5wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff (Abb. 39) und 5wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig (Abb. 40) dargestellt.

Im Vergleich mit Abb. 31 (nach 3 1/2wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff) zeigt sich in Abbildung 39 eine weitere Zunahme des retikulären Bindegewebes und eine Verbreiterung der Glisson'schen Felder. In Abbildung 40 stellt sich jedoch ähnlich wie in Abbildung 32 ein normaler Gehalt der Sinusoide an retikulärem Bindegewebe dar. Damit kann die zusätzliche Behandlung mit Catechin den "Schutz"-Effekt, der nach 3 1/2wöchiger Behandlung zu beobachten war (Abb. 31 und 32), auch nach 5wöchiger Belastung mit Tetrachlorkohlenstoff aufrechterhalten (Abb. 39 und 40).

Abb. 39: Tetrachlorkohlenstoff 5 Wochen, Silberimprägnation nach LENDRUM, Vergr. 125x

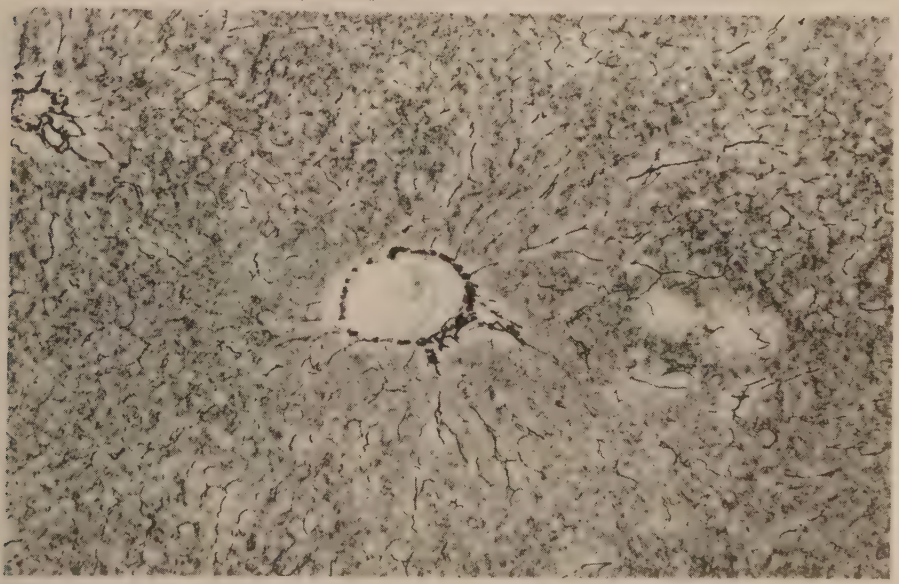

Abb. 40: Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig 5 Wochen, Silberimprägnation nach LENDRUM, Vergr. 100x

Die Abbildung 41 zeigt in der HE-Färbung die histologischen Veränderungen nach 4wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Abbildungen wurden diese Tiere vor Beginn der gleichzeitigen Tetrachlorkohlenstoff- und Catechin-Behandlung 2 Wochen lang mit Catechin allein vorbehandelt.
Der Vergleich von Abbildung 41 mit Abbildung 26 (nach 3 1/2wöchiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig ohne Catechin-Vorbehandlung) ergibt in qualitativer wie in quantitativer Hinsicht dieselben histologischen Veränderungen, so daß durch die Vorbehandlung der Tiere mit Catechin kein zusätzlicher günstiger Effekt gegenüber den durch Tetrachlorkohlenstoff ausgelösten Veränderungen erreicht werden kann, verglichen mit der Situation, in der Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig ohne Vorbehandlung mit Catechin appliziert wurden (Abb. 26).

Die Abbildung 42 zeigt den Gehalt der Lebersinusoide an retikulärem Bindegewebe unter denselben Behandlungsbedingungen wie in Abbildung 41, also nach 4wöchiger gleichzeitiger Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin, der eine Vorbehandlung mit Catechin alleine von 2 Wochen vorausging.
Im Vergleich mit Abbildung 32 zeigt sich in Abbildung 42 eine Verminderung der retikulären Fasern der Sinusoide.

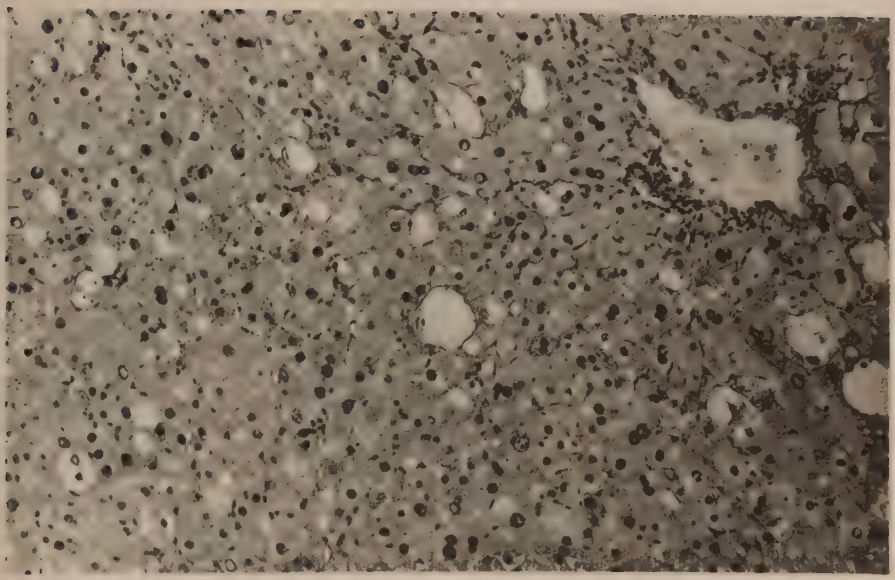

Abb. 41: Catechin und Tetrachlorkohlenstoff 4 Wochen.
Zuvor Vorbehandlung mit Catechin 2 Wochen. HE,Vergr. 100x

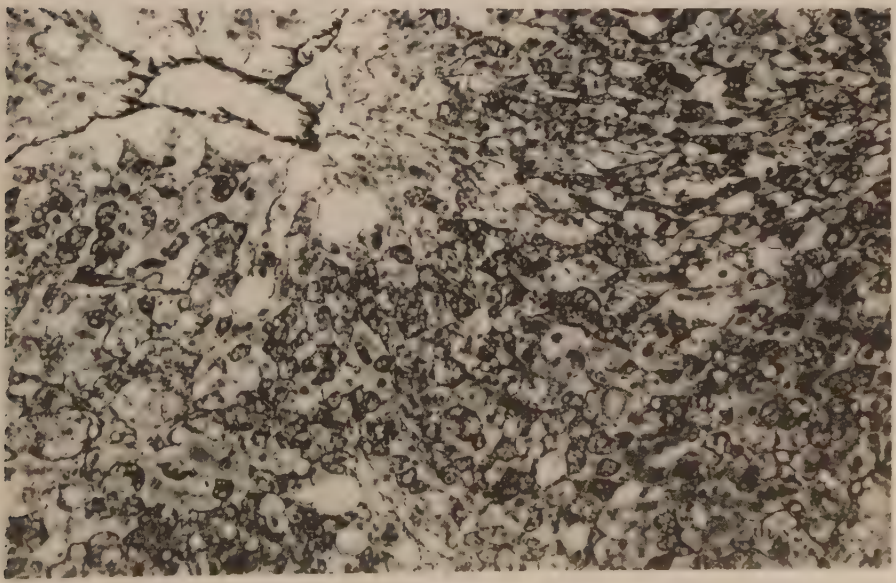

Abb. 42: Catechin und Tetrachlorkohlenstoff 4 Wochen. Zuvor 2wöchige Vorbehandlung mit Catechin. Silberimprägnation nach LENDRUM,Vergr.100x

Ob sich jedoch daraus ein günstiger Effekt der Catechin-Vorbehandlung ableiten läßt, kann damit alleine nicht sicher entschieden werden.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung einer chronischen Catechin-Applikation auf die chronische Tetrachlorkohlenstoff-Intoxikation bei Ratten untersucht. Es wurden die Körpergewichte der Tiere, einige biochemische Parameter im endoplasmatischen Retikulum der Leber (Lebermikrosomen) der Tiere und die Morphologie der Lebern kontrolliert.

Boratpuffer wurde als Lösungsmittel für Catechin gewählt, weil das in Wasser kaum lösliche Catechin so leicht in Lösung gebracht und den Tieren appliziert werden konnte. Nach GELBKE et al. (1976) bilden zwei Catechol-Moleküle bei alkalischem pH einen Komplex mit einem Borsäure-Molekül, der je nach pH dissoziiert. Im sauren Milieu des Magens und im schwach alkalischen des Duodenums wird der Komplex wieder gespalten. Da das Catechin im Duodenum leicht resorbiert wird (DAS, 1971), kann davon ausgegangen werden, daß nach oraler Gabe eine relativ hohe Konzentration im Blut der Versuchstiere vorlag (vergl. v. BERGMAN, 1974; GILES u. GUMMA, 1973; BARENCO et al., 1973).

Bei allen Versuchsanordnungen zeigte sich, daß die Lösungsmittel, die für die Applikation von Catechin oder Tetrachlorkohlenstoff Verwendung fanden, und die Behandlung selbst ohne Einfluß auf den Gewichtsverlauf, die biochemischen Parameter und das histologische Bild der Leber waren.

Die Behandlung mit Catechin alleine führte ebenfalls zu keinen signifikanten Veränderungen der Lebermorphologie. Ebenso wenig wurden der Gewichtsverlauf der Tiere und die enzymatischen Parameter in der Leber durch Catechin beeinflußt. Lediglich die spontane Lipidperoxidation war in Mikrosomen, die von Catechin-behandelten Tieren stammten, geringer. Diese Befunde, die zeigen, daß Catechin praktisch keine Eigenwirkung auf die gemessenen Parameter hat, lassen die Schlußfolgerung zu, daß alle gefundenen Unterschiede zwischen gleichzeitiger Tetrachlorkohlenstoff- und Catechin-Applikation und alleiniger Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung der Tiere dadurch verursacht wurden, daß Catechin die Tetrachlorkohlenstoff-bedingten Schädigungsprozesse massiv beeinflußt.

Die Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung wurde nach Standardmethoden durchgeführt, da nur so mit der Literatur vergleichbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Die chronische Tetrachlorkohlenstoff-Applikation führte, wie bereits mehrfach berichtet, auch bei den vorliegenden Untersuchungen zu einer Abnahme des Körpergewichts der Tiere während der Behandlung. Daneben wurde ein starker Abfall der für den Fremdstoffwechsel notwendigen Enzyme des endoplasmatischen Retikulums der Leberzellen, Cytochrom P-450, Cytochrom b-5 und NADPH-Cytochrom c Reduktase, entsprechend den Angaben der Literatur (SLATER u. RECKNAGEL, 1969;

REINER et al., 1972; COX et al., 1972) beobachtet. Auch die Aktivität der Enzyme, gemessen mit Hilfe der Modellsubstrate Anilin und p-Nitro-Anisol, war nach chronischer Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung stark vermindert. Die bei der verwendeten Tetrachlorkohlenstoff-Dosis stets beobachtete Reversibilität all dieser Parameter konnte auch in den vorliegenden Untersuchungen gefunden werden. Erwartungsgemäß nahm auch die sogenannte spontane Lipidperoxidation der von chronisch Tetrachlorkohlenstoff-behandelten Tieren isolierten Lebermikrosomen stark zu. Diese "spontane" Lipidperoxidation, die bei Kontrolltieren sehr gering ist, könnte durch noch in den mikrosomalen Membranen vorhandenen Tetrachlorkohlenstoff bedingt sein, das während der Inkubation NADPH-abhängig metabolisch aktiviert wird. Dies ist aber deshalb unwahrscheinlich, weil auch noch 2 Wochen nach Absetzen von Tetrachlorkohlenstoff erhöhte Lipidperoxidations-Werte gemessen wurden, zu einer Zeit, wo mit Sicherheit kein Tetrachlorkohlenstoff mehr im Körper vorhanden ist. Möglicherweise zerfallen auch während der in vitro-Inkubation der Lebermikrosomen in vivo präformierte, durch Tetrachlorkohlenstoff-Wirkung gebildete Lipidperoxide spontan, wobei in vitro Malondialdehyd entsteht. Diese Frage kann aber durch die vorliegenden Befunde nicht beantwortet werden.

Die Frage nach einem Zusammenhang zwischen einer Lipidperoxidation, die durch Tetrachlorkohlenstoff in vivo ausgelöst wird, und der Toxizität von Tetrachlorkohlenstoff schließt sich unmittelbar an: Nach neueren Befunden von RODERS et al. (1978) können Lipidperoxide das endoplasmatische Retikulum der Leberzelle nach ihrer Bildung verlassen und andere Membranen angreifen und zerstören. Die Schädigung von Zellorganellen würde also dann auch an solchen Zellpartikeln stattfinden, die selbst gar keinen Tetrachlorkohlenstoff metabolisch aktivieren können, wie z.B. die Mitochondrien der Leberzellen, die in der Regel schon sehr früh nach Tetrachlorkohlenstoff-Applikation in vivo Veränderungen zeigen.

Daneben muß man annehmen, daß die direkte chemische Reaktion von Tetrachlorkohlenstoff-Metaboliten, z.B. des CCl_3-Radikals, und dessen kovalente Bindung an Zellbestandteile nur in den Regionen der Zelle in Erscheinung tritt, wo auch die Tetrachlorkohlenstoff-aktivierenden Enzyme vorhanden sind. Da höchstwahrscheinlich Cytochrom P-450 für die metabolische Aktivierung von Tetrachlorkohlenstoff verantwortlich ist (McLEAN, 1967, REINER et al., 1972; O'BRIEN et al., 1975; WEDDLE et al, 1976), kommen als Reaktionspartner von CCl_3-Radikalen vor allem Proteine, Lipide und Nukleinsäuren des endoplasmatischen Retikulums der Leberzelle in Frage. Dies findet seine Bestätigung in

der Tatsache, daß diese Membranen nach Gabe von radioaktivem Tetrachlorkohlenstoff die höchste Markierung von nicht extrahierbarer Radioaktivität aufweisen (UEHLEKE et al., 1973).

Die starke Abnahme der Enzyme des endoplasmatischen Retikulums der Leberzelle wird mit der direkten Reaktion von CCl_3-Radikalen mit diesen Enzymen in Verbindung gebracht (SLATER, 1972). Diese Anschauung blieb jedoch nicht ohne Kritik (WILLS, 1971). Die antihepatotoxische Wirkung von Antioxidantien, zu denen auch das Catechin zu rechnen ist, gegenüber der Tetrachlorkohlenstoff-Intoxikation kommt nun möglicherweise nicht nur dadurch zustande, daß primär gebildete Radikale, die aus Tetrachlorkohlenstoff entstehen, wie z.B. das CCl_3-Radikal, von Antioxidantien abgefangen werden. Es ist durchaus auch denkbar, daß Substanzen mit antioxidanten Eigenschaften die Aktivierung von Tetrachlorkohlenstoff am Cytochrom P-450 hemmen, oder daß sie in einem Sekundärprozeß den Zerfall von Tetrachlorkohlenstoff-bedingten präformierten, labilen Lipidperoxiden stoppen. Die erstgenannten Wirkungen könnten die Antioxidantien nur am Ort der Aktivierung von Tetrachlorkohlenstoff, also im endoplasmatischen Retikulum zeigen, da sie sehr kurzlebige Radikale abfangen müßten; letztere wäre überall in der Zelle möglich, wo Lipidperoxide hingelangen können. Wenn also Tetrachlorkohlenstoff sowohl Enzyme des endo-

plasmatischen Retikulums direkt inaktiviert, als auch für die Bildung von Lipidperoxiden verantwortlich ist, die indirekt schädigen können, dann könnten verschiedene Antioxidantien diese beiden Effekte ganz unterschiedlich beeinflussen. Die vorliegenden Befunde mit Catechin legen die Vermutung nahe, daß tatsächlich verschiedene Wirkungen des Tetrachlorkohlenstoffs auf die Zellen unterschiedlich beeinflußt werden:
Weder die durch chronische Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung stark verminderte Menge der Cytochrome P-450 und b-5, noch die entsprechend erniedrigten Enzymaktivitäten der NADPH-Cytochrom c Reduktase und des Fremdstoffumsatzes konnten durch die gleichzeitige Catechin-Behandlung auf signifikant höhere Werte gebracht werden. Eine zweiwöchige Vorbehandlung hatte ebenfalls keinen Einfluß auf diese Parameter. Es ist also sehr wahrscheinlich, daß Catechin in der verwendeten Dosierung (300 mg/kg) keinen Einfluß auf den direkten zerstörerischen Effekt des Tetrachlorkohlenstoffs auf die Enzyme des endoplasmatischen Retikulums hat. Den Zerfall der Tetrachlorkohlenstoff-abhängig gebildeten Peroxide aus Lipiden scheint aber Catechin sehr wohl zu beeinflussen. Dies kann zum einen aus der in vitro verminderten Lipidperoxidation geschlossen werden, die geringer ist, wenn Tetrachlorkohlenstoff und Catechin gleichzeitig appliziert wurden, verglichen mit der alleinigen Tetrachlorkohlenstoff-Applikation.

Zum anderen zeigen die histologischen Befunde der vorliegenden Arbeit, daß Catechin einen protektiven Einfluß auf zahlreiche Parameter hat, die durch Tetrachlorkohlenstoff beeinflußt werden.

Unter alleiniger Behandlung mit Boratpuffer zeigt sich ebenso wie unter ausschließlicher Behandlung mit Catechin, gelöst in Boratpuffer, eine völlig intakte Läppchenstruktur der Leber. Es treten keine lymphohistiocytären Infiltrationen und keine zellulären Veränderungen im Sinne einer hydropischen Schwellung oder Verfettung auf. Die Bilder gleichen denen, die mit unbehandelten Kontrolltieren erhalten wurden. Die Sinusoide und die Glisson'schen Felder stellen sich unauffällig dar. Die diffuse Verteilung des Glykogens in den Leberläppchen, insbesondere unter alleiniger Behandlung mit Boratpuffer, ist möglicherweise Ausdruck einer reduzierten Glukoneogenese,wie sie unter Behandlung mit alkalischen Substanzen auftreten kann. Insgesamt aber zeigen die untersuchten histologischen Parameter, daß Catechin bzw. Catechin und Boratpuffer ohne toxische Wirkung auf die Leber sind.

Die unter 3 1/2wöchiger Applikation von Tetrachlorkohlenstoff auftretenden histologischen Veränderungen im Sinne einer schweren Strukturstörung der Leberläppchen mit massiven lymphohistiocytären Infiltraten, Vermehrung und Schwellung der Kupfferschen Sternzellen, einer hydropischen Schwellung der Hepatozyten mit Zeichen der Regenaration treten unter gleichzeitiger

Behandlung der Tiere mit Catechin und Tetrachlorkohlenstoff in wesentlich geringerem Ausmaß auf als bei alleiniger Applikation von Tetrachlorkohlenstoff. Auch zeigt sich unter gleichzeitiger Behandlung der Tiere mit Catechin und Tetrachlorkohlenstoff nur eine geringe Zunahme der retikulären Fasern und eine mäßige Glykogenentspeicherung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren, während unter ausschließlicher Applikation von Tetrachlorkohlenstoff eine massive Zunahme der retikulären Fasern und eine erhebliche Glykogenentspeicherung festzustellen ist im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren. Damit wird auch hier der "Schutz"-Effekt von Catechin gegenüber den durch die chronische Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung ausgelösten histologischen Veränderungen deutlich.

Auch nach 5wöchiger Behandlung der Tiere mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin zeigt sich eine deutlich geringere Schädigung der Leber als nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff alleine. Der Effekt nach 5wöchiger Behandlung entspricht qualitativ dem nach 3 1/2 Wochen. Somit kann durch zusätzliche Behandlung mit Catechin eine "Schutz"-Wirkung gegenüber den Veränderungen der Leber erzielt werden, die bei alleiniger Behandlung der Tiere mit Tetrachlorkohlenstoff auftreten. Unsicher ist der Effekt von Catechin auf die Glykogenentspeicherung der Leberzellen, die durch Tetrachlorkohlenstoff induziert wird. Denn nach 5wöchiger Behandlungsdauer ist sowohl

unter gleichzeitiger Behandlung mit Catechin und Tetrachlorkohlenstoff wie auch unter ausschließlicher Applikation von Tetrachlorkohlenstoff ein weitgehender, insbesondere zentrilobulärer, Glykogenschwund zu beobachten.

Eine Vorbehandlung der Tiere mit Catechin vor Einsetzen der Applikation von Tetrachlorkohlenstoff zusammen mit Catechin kann den günstigen Effekt der Catechin-Behandlung nicht weiter verbessern. Allerdings zeigt sich nach Catechin-Vorbehandlung ein geringerer Gehalt der Leberläppchen an retikulärem Bindegewebe, verglichen mit dem Bindegewebsgehalt der Lebern der Tiere, bei denen die Behandlung mit Catechin und Tetrachlorkohlenstoff gleichzeitig einsetzte. Ob sich daraus ein protektiver Effekt von Catechin gegenüber der Tetrachlorkohlenstoff-Vergiftung ableiten läßt, kann hieraus noch nicht eindeutig entschieden werden.

Alle mit Hilfe der Histologie erfaßbaren Veränderungen der Leber, die durch Tetrachlorkohlenstoff ausgelöst werden, sind wahrscheinlich eng verknüpft mit der Hepatotoxizität dieser chemischen Verbindung.
Es erscheint durchaus möglich, daß die Leberschädigung, die Tetrachlorkohlenstoff-bedingt auftritt, nicht mit der Zerstörung der Enzyme des

endoplasmatischen Retikulums parallel verläuft. Die vorliegenden Befunde lassen eher auf eine Dissoziation der Zerstörung der Enzyme des Fremdstoffabbaus und der eigentlichen Leberschädigung schließen. Denn dieselben Lebern, die praktisch kaum Bindegewebsvermehrung, Fettinfiltration und nur teilweise Glykogenentspeicherung zeigten, hatten stark erniedrigte Enzymgehalte. Andere Befunde aus unserer Arbeitsgruppe legen die Vermutung nahe, daß Catechin tatsächlich in der Lage ist, die Hepatotoxizität von Tetrachlorkohlenstoff günstig zu beeinflussen. Denn nach akuter Gabe von 250 mg $CBrCl_3$/kg an Ratten zusammen mit Catechin (300 mg/kg) starben keine Tiere (D. KÖSTER, 1978). Die Dosis von 250 mg $CBrCl_3$/kg entspricht aber ziemlich genau der LD_{50} von $CBrCl_3$.

Aus den hier vorgelegten histologischen Befunden, die zeigen, daß Catechin vor allem gegenüber den Parametern der Tetrachlorkohlenstoff-bedingten Zellschädigung protektiv wirkt, die relativ spät in Erscheinung treten, wie z.B. Bindegewebsveränderungen der Zellen, während die frühen Veränderungen, wie z.B. Glykogenentspeicherung, sich nicht in demselben starken Ausmaß unterscheiden, kann gefolgert werden, daß die Dosis-Relation und der Zeitpunkt der Applikation beider Substanzen bei der chronischen Behandlung der Tiere entscheidend sind für den protektiven Catechin-Effekt. Vielleicht kann Catechin auch gar nicht

primäre Schädigungsprozesse in der Leber hemmen, indem es mit Radikalen von Tetrachlorkohlenstoff oder mit Lipidperoxiden reagiert. Möglicherweise beruht der protektive Effekt des Catechins bei der chronischen Behandlung auf einem Einfluß gegenüber anderen, bisher noch unbekannten, biochemischen Mechanismen, die im Verlauf des Schädigungsprozesses auftreten. Man muß dabei auch daran denken, daß Catechin eine hohe Membranaffinität hat und stabilisierend auf Membranen wirken soll (NIEBES u. PONARD, 1974; SLATER, 1969; CETTA et al., 1971; CANEGHAM, 1972; BERTELLI, 1974).
Die in vitro- und in vivo-Befunde einer Hemmung der Lipidperoxidation durch Catechin (SLATER u. SAWYER, 1971) machen es aber wahrscheinlich, daß Catechin tatsächlich durch Hemmung einer Peroxidation von Lipiden in der Zelle antihepatotoxisch wirkt. Wo und zu welchem Zeitpunkt eine Lipidperoxidation gehemmt werden muß, damit die Schädigung der Leberzelle, die durch Tetrachlorkohlenstoff verursacht wird, gering gehalten wird, kann nicht vorhergesagt werden. Für die gesamte toxikologische Beurteilung des Catechin-Effekts sind darüber hinaus auch Untersuchungen in anderen Organen des Organismus notwendig. Zumindest der auch in Gegenwart von Catechin beobachtete Gewichtsverlust der Tiere nach Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung, der einhergeht mit einem protektiven Effekt des Catechins auf bestimmte Parameter in der Leber, macht die Komplexizität der Toxizität des Tetrachlorkohlenstoffs für den Gesamt-

organismus deutlich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die vorliegenden Untersuchungen einen protektiven Effekt von Catechin, einem vor kurzem als Leberschutzmittel in den Handel eingeführten Arzneimittel, auf die Hepatotoxizität von Tetrachlorkohlenstoff ergeben haben, der nicht parallel verläuft mit den Aktivitäten bestimmter Enzyme des endoplasmatischen Retikulums der Leberzellen. Diese Befunde sind für die Therapie gerade jetzt von besonderer Bedeutung, da Catechin als "unwirksames" Arzneimittel heftig angegriffen wurde, weil es beim Menschen, wie zunächst angenommen, nicht oder nur wenig wirksam war gegen die Virus-induzierte Hepatitis (BOREL et al., 1974; SEYFRIED et al., 1974) bei der es in erster Linie therapeutisch eingesetzt werden sollte. Zusätzlich eröffnen sich viele experimentelle Möglichkeiten, mit Hilfe dieser relativ wenig toxischen Substanz (LD_{50} = 13 g/kg) mehr Informationen über die Mechanismen Fremdstoff-induzierter toxischer Prozesse, wie sie z.B. nach Tetrachlorkohlenstoff im Organismus auftreten, zu erhalten.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung einer chronischen Gabe von Catechin auf die durch Tetrachlorkohlenstoff hervorgerufene chronische Leberschädigung untersucht. Der Gewichtsverlauf der Tiere, einige biochemische Parameter des endoplasmatischen Retikulums der Lebermikrosomen und die Morphologie der Lebern wurden gemessen. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1) Die für die Applikation von Catechin und Tetrachlorkohlenstoff verwendeten Lösungsmittel, insbesondere der Boratpuffer, sowie die Behandlung selbst, zeigten keinerlei Einfluß auf den Gewichtsverlauf der Tiere, die untersuchten biochemischen Parameter, sowie auf das histologische Bild der Lebern gegenüber Kontrolltieren.

2) Ebenso ergab die ausschließliche Behandlung der Tiere mit Catechin, gelöst in Boratpuffer, keine Veränderungen der gemessenen Parameter gegenüber Kontrolltieren.

3) Die chronische Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff führte zu einer starken Abnahme des Körpergewichtes der Tiere und zu einer Abnahme der für den Fremdstoffwechsel notwendigen Enzyme des endoplasmatischen Retikulums, der Cytochrome P-450 und b-5 und der Aktivität der NADPH-Cytochrom c Reduktase. Außerdem zeigte

sich ein signifikanter Abfall der Metabolisierungsrate von Anilin und p-Nitro-Anisol in vitro. Parallel dazu ergab sich eine Steigerung der Lipidperoxidation in den Lebermikrosomen auf das 10fache der Kontrolle.

4) Unter der gleichzeitigen Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Catechin zeigte sich lediglich eine Hemmung der Abnahme des Cytochroms b-5 in den Lebermikrosomen, verglichen mit der alleinigen Tetrachlorkohlenstoff-Applikation. Der starke Abfall der übrigen biochemischen Parameter konnte durch die Catechin-Behandlung nicht verhindert werden. Lediglich die Rückbildung der unter Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung aufgetretenen Veränderungen konnte durch Catechin beschleunigt werden. Dagegen konnten die durch Tetrachlorkohlenstoff induzierten histologisch meßbaren Veränderungen durch die Catechin-Behandlung sehr effektiv gehemmt werden. Ebenso konnte durch die zusätzliche Gabe von Catechin der unter alleiniger Tetrachlorkohlenstoff-Applikation beobachtete starke Anstieg der Lipidperoxidation in den Lebermikrosomen verhindert werden.

5) Eine Catechin-Vorbehandlung vor Einsetzen der Applikation von Tetrachlorkohlenstoff zusammen mit Catechin verminderte die Lipidperoxidation auf Werte, die mit denen der "spontanen" Lipidperoxidations-

rate identisch waren. Alle anderen biochemischen Parameter und die Morphologie der Lebern konnten durch eine zusätzliche Vorbehandlung der Tiere mit Catechin nicht noch weiter verbessert werden.

6) Die vorliegenden Befunde lassen auf eine Dissoziation der durch Tetrachlorkohlenstoff induzierten Zerstörung der Enzyme des Fremdstoff-**metabolisierenden** Enzymsystems und der morphologisch faßbaren Leberschädigung schließen. Catechin scheint in der verwendeten Dosierung keinen protektiven Einfluß auf den direkt zerstörerischen Effekt des Tetrachlorkohlenstoffs auf die Enzyme des endoplasmatischen Retikulums zu haben.

Die gezeigte antihepatotoxische Wirksamkeit von Catechin gegenüber Tetrachlorkohlenstoff könnte auf der Hemmung der Lipidperoxidation in der Zelle beruhen. Wo und zu welchem Zeitpunkt Catechin in die Lipidperoxidation der Zelle hemmend eingreift, kann aus den vorliegenden Befunden allein nicht entschieden werden.

6. Literaturverzeichnis

BARENCO, A., J. CRUCHET, A. GUMMA:
Etude biopharmaceutique du cyanidanol dans deux formes galéniques. Contribution à l'étude de ses métabilites dans le sang et l'urine. Gutachten Firma Zyma, Nyon (1973).

BASSI, M.: Electron-microscopy of rat liver after carbon tetrachloride poisoning.
Exp. Cell Res., 20, 313-323 (1960).

BENEDETTI, A., M. FERRALI, A. CASINI and M. COMPORTI:
Liver glutathione peroxidase activity and CCl_4-induced lipid peroxidation in selenium treated rats.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 9, 711-718 (1974).

BERGMAN, K. von: Pharmakokinetik und Toleranzstudie über ^{14}C markiertes Catechin. Gutachten, Firma Zyma, Nyon (1974).

BERTELLI, A.: Pharmacological aspects of (+)-cyanidanol-3.
In: New trends in the therapy of liver diseases.
Int. Symp., Tirrenia, S. Karger, Basel, 92-99 (1975).

BINI, A., G. VECCHI, G. VIVOLI, V. VANNINI and C. Cessi: Detection of early metabolites in rat liver after administration of CCl_4 and $CBrCl_3$. Pharmacol. Res. Commun. 7, 143-149 (1975).

BÖHM, K.: Die Flavonoide. Editio Cantor, Aulendorf (1967).

BÖRNIG, H., G. RICHTER and H. FRUNDER: Der Stoffwechsel geschädigter Gewebe, XII. Mitochondrien und Nucleinsäuren in den Zellfraktionen der Leber CCl_4-geschädigter Mäuse. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 322, 213-231 (1960).

BOREL, G.A., J.L. SCHELLING and P. MAGNENAT: Effects of (+)-cyanidanol-3, a new flavanoid, in acute viral hepatitis. In: New trends in the therapy of liver diseases. Int. Symp., Tirrenia, S. Karger, Basel, 170-176 (1975).

BUTLER, T.C.: Reduction of carbon tetrachloride in vivo and reduction of carbon tetrachloride and chloroform in vitro by tissues and tissue constituents. J. Pharmacol. Exp. Ther. 134, 311-319 (1961).

CAMERON, G.R. and W.A.E. KARUNARATNE: Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. J. Pathol. Bact., 42, 1-21 (1936).

CANEGHAM, P. van: Influence of some hydrosoluble substances with vitamin P activity on the fragility of lysosomes in vitro. Biochem. Pharmacol. 21, 1543-1548 (1972).

CASTRO, J.A., C.R. De CASTRO, N. D'ACOSTA, M.I. DIAZ GOMEZ and E.C. DeFERREYRA: Carbon tetrachloride activation in liver microsomes from rats induced with 3-methyl-cholanthrene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 273-279 (1973).

CASTRO, J.A., C.R. De CASTRO, O.M. De FENOS, E.C. De FERREYRA, M.I. DIAZ GOMEZ and N. D'ACOSTA: Effect of cystamine on the mixed-function oxygenase system from rat liver microsomes and its preventive effect on the destruction of cytochrom P-450 by carbon tetrachloride. Pharmacol. Res. Commun. 4, 185-193 (1972).

CASTRO, J.A. and M.I. DIAZ GOMEZ: Further studies on the mechanism of carbon tetrachloride induced polysome breakdown. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 13, 731-741 (1976).

CASTRO, J.A., M.I. DIAZ GOMEZ, E.C. De FERREYRA, C.R. De CASTRO, N. D'ACOSTA and O.M. De FENOS: Carbon tetrachloride effect on rat liver and adrenals related to their mixed-function oxygenase content. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 315-321 (1972).

CASTRO, J.A., E.C. De FERREYRA, C.R. De CASTRO, M.I. DIAZ GOMEZ, N. D'ACOSTA and O.M. De FENOS: Studies on the mechanism of cystamine prevention of several liver structural and biochemical alterations caused by carbon tetrachloride. Toxicol. Appl. Pharmacol. 24, 1-19 (1973).

CASTRO, J.A., H.A. SASAME, H. SUSSMAN, J.R. GILLETTE: Diverse effects of SKF 525A and antioxidants on carbon tetrachloride-induced changes in liver microsomal P-450 content and ethylmorphine metabolism. Life Sci. 7, 129-136 (1968).

CETTA, G., G. GERRELI, A. QUARTIERI and A. CASTELLANI: Protective effect of flavanoids on the collagen of lathyritic rats. Experientia 27, 1046-1048 (1971).

CHAN, J.T., J.O. FORD, A.H. RUDOLPH and H.S. BLACK: Physiological changes in hairless mice maintained on an antioxidant supplemented diet. Experientia 33, 41-42 (1976).

CHAN, H.W.-S. and L. GORDON: Autoxidation of methyl linoleate. Separation and analysis of isometric mixtures of methyl linoleate hydroperoxides and methyl hydroxylinoleates. Lipids 12, 99-104 (1977).

CHOPRA, P., S. ROY, V. RAMALINGASWARNI and N. NAYAK: Mechanism of carbon tetrachloride hepatoxicity. An in vivo study of its molecular basis in rats and monkeys. Lab. Invest. 26, 716-721 (1972).

CHRISTIE, G.S. and J.D. JUDAH: Mechanism of action of carbon tetrachloride on liver cells. Proc. Roy. Soc. B., 142, 241-257 (1954).

CHVAPIL, M., A.L. ARONSON and Y.M. PENG: Relation between zinc and iron and peroxidation of lipids in liver homogenate in CaEDTA-treated rats. Exp. Mol. Pathol. 20, 216-227 (1974).

CHVAPIL, M., L. STANKOVA and V. MALSHET: Lipid peroxidation as one of the mechanisms of silica fibrogenicity? I. Study with erythrocytes. Environ. Res. 11, 78-88 (1976).

CIGNOLI, E.V. and J.A. CASTRO: Effect of inhibition of drug metabolizing enzymes on carbon tetrachloride hepatotoxycity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 18, 625-637 (1971).

CIGNOLI, E. and J.A. CASTRO: Lipid peroxidation, necrosis and the in vivo depression of liver glucose 6-phosphatase by carbon tetrachloride. Exp. Mol. Pathol. 14, 43-56 (1971).

CLIFFORD, J.I., K.R. REES: Biochemical changes in the endoplasmic reticulum in liver injury. J. Pathol. Bact. 91, 215-222 (1966).

COHEN, G. and R.E. HEIKKILA: The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. J. Biol. Chem. 249, 2447-2452 (1974).

COMPORTI, M., C. SACCOCCI, M.U. DIANZANI: Effect of CCl_4 in vitro and in vivo on lipid peroxidation of rat liver homogenates and subcellular fractions. Enzymologia 29, 185-204 (1965).

COX, P.J., L.J. KING and D.v. PARKE: A comparison of the interactions of trichlorofluoromethane and carbon tetrachloride with hepatic cytochrome P-450. Biochem. J. 130, 87-94 (1972).

DALLNER, G., Ph. SIEKEVITZ and G.E. PALADE: Synthesis of microsomal membranes and their enzymic constituents in developing rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 135-141 (1965).

DAMBRAUSKAS, T. and H.H. CORNISH: Effect of pretreatment of rats with carbon tetrachloride on tolerance development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 17, 83-97 (1970).

DAS, N.P.: Studies on flavonoid metabolism. Distribution of radioactivity in rat tissues after introduction of (+)-(U-^{14}C)-catechin into the organism. Gutachten,Firma Zyma, Nyon (1970).

DAS, N.P.: Studies on flavonoid metabolism. Absorption and metabolism of (+)-catechin in man. Biochem. Pharmacol. 20, 3435-3445 (1971).

DAS, N.P.: Studies on flavonoid metabolism. Distribution of radioactivity after oral and interaperitoneal administration of ring A specifically labelled (^{14}C)-catechin and ring B specifically labelled (^{14}C)-catechin. Gutachten, Firma Zyma, Nyon (1972).

DAS, N.P.: Studies on flavonoid metabolism. Excretion of m-hydroxyphenylhydracrylic acid from (+)-catechin in the monkey. Gutachten, Firma Zyma, Nyon (1973).

DAS, N.P., S.P. SOTHY: Studies on flavonoid metabolism. Biliary and urinary exretion of metabolites of (+)-(U-^{14}C)catechin. Biochem. J. 125, 417-423 (1971).

DESAI, I.D., P.L. SAWANT, A.L. TAPPEL: Peroxidative and radiation damage to isolated lysosomes. Biochim. Biophys. Acta 86, 277-285 (1964).

DIANZANI, M.: La perossidazione dei lipidi nella patogenesi delle lesione epatiche. Il Tegato 16, 259-278 (1970).

DIANZANI, M., F. BACCINO and M. COMPORTI: The direct effect of carbon tetrachloride on subcellular particles. Lab. Invest. 15, 149-156 (1966).

Di LUZIO, N.R.: Antioxidants, lipid peroxidation and chemical induced liver injury. Fed. Proc. 32, 1875-1881 (1973).

Di LUZIO, N.R.: Influence of intravenously administered hexahydrocoenzyme Q_4 on liver injury. Life Sci. 5, 1467-1478 (1966).

Di LUZIO, N.R.: The employment of antioxidants in the prevention and treatment of experimentally induced liver injury. Progr. Biochem. Pharmacol. 3, 325-342 (1967).

Di LUZIO, N.R.: The role of lipid peroxidation and antioxidants in ethanol-induced lipid alterations. Exp. Mol. Pathol. 8, 394-402 (1968).

Di LUZIO, N.R. and A.D. HARTMANN: Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of the ethanol-induced fatty liver. Fed. Proc. 26, 1436-1442 (1967).

DINGELL, J.V. and M. HEIMBERG: The effects of aliphatic halogenated hydrocarbons on hepatic drug metabolism. Biochem. Pharmacol. 17, 1269-1276 (1968).

EHRLICH, P.: Hämatoxylinlösung. Z. Wiss. Mikr. 3 150-156 (1886).

EHRLICH, P.: Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes (1891).

ERNSTER, L. and K. NORDENBRAND: Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology 10, 574-580 (1967).

ERNSTER, L. and S. ORRENIUS: Substrate-induced synthesis of the hydroxylating enzyme system of liver microsomes. Fed. Proc. 24, 1190-1199 (1965).

ESENBECK, Nees von, F.: Über das Catechu aus Nauclea im Vergleich mit den übrigen Sorten. Repertorium für Pharmazie 33, 169-185 (1830).

ESENBECK, Nees von, F.: Über Katechu und die darin enthaltene eigentümliche krystallinische Substanz. Repertorium für Pharmazie 43, 337-353 (1832).

ESENBECK, Nees von, F.: Über Kino und Extr. Ratanniae amer. Repertorium für Pharmazie 27, 211-216 (1830).

ESENBECK, Nees von, F.: Bemerkungen über Catechu. Ann. Chem. 1, 243-245 (1832).

FOLLAND, D.S., W. SCHAFFNER, H.E. GINN, O.B. CROFFORD, D.R. McMURRAY: Carbon tetrachloride toxicity potentiated by isopropyl alcohol. J. Am. Med. Ass. 236, 1853-1856 (1976).

FREUDENBERG, K., K. WEINGES: Systematik und Nomenklatur der Flavonoide. Tetrahedron 8, 336-342 (1960).

FRUNDER, H., W. FISCHER und H. BÖRNIG: Die primären Stoffwechselveränderungen in der Leber nach CCl_4-Vergiftung. II. Mitt. Der Stoffwechsel geschädigter Gewebe. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 306, 112-119 (1956).

GALLAGHER, C.H.: The effect of antioxidants on poisoning by carbon tetrachloride. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 40, 241-253 (1962).

GARNER, R.C., A.E.M. McLEAN: Increased susceptibility to carbon tetrachloride poisoning in the rat after pretreatment with oral phenobarbitone. Biochem. Pharmacol. 18, 645-654 (1969).

GHOSHAL, A.K.: Antioxidant role of vitamin E and carbon tetrachloride hepatotoxicity. Exp. Mol. Pathol. 25, 202-207 (1976).

GHOSHAL, A.K., R.O. RECKNAGEL: Positive evidence of acceleration of lipid peroxidation in rat liver by carbon tetrachloride: in vitro experiments. Life Sci. 4, 1521-1530 (1965a).

GHOSHAL, A.K., R.O. RECKNAGEL: On the mechanism of carbon tetrachloride hepatotoxicity: Co-incidence of loss of glucose-6-phosphatase activity with peroxidation of microsomal lipid. Life Sci. 4, 2195-2209 (1965b).

GILES, A.R., A. GUMMA: Biopharmaceutical evaluation of cyanidanol tablets using pharmacokinetic techniques. Arzneimittelforsch. 23, 98-100 (1973).

GLENDE, E.A., Jr.: Carbon tetrachloride-induced protection against carbon tetrachloride toxicity. The role of the liver microsomal drug-metabolizing system. Biochem. Pharmacol. 21, 1697-1702 (1972).

GLENDE, E.A., Jr. and R.O. RECKNAGEL: Biochemical basis for the in vitro prooxidant action of carbon tetrachloride. Exp. Mol. Pathol. 11, 172-185 (1969).

GLENDE, E.A., Jr. and R.O. RECKNAGEL: Microsomal electron transport and in vitro CCl_4-induced lipoperoxidation. Fed. Proc. 29, 755-769 (1970).

GOLDNER, J.: A modification of the Masson trichrom technique for routine laboratory purpose. Am. J. Pathol. 14, 237-243 (1938).

GORDIS, E.: Lipid metabolites of carbon tetrachloride. J. Clin. Invest. 48, 203-211 (1969).

GRAM, T.E. and J.R. FOUTS: Effect of α-tocopherol upon lipid peroxidation and drug metabolism in hepatic microsomes. Arch. Biochem. Biophys. 114, 331-335 (1966).

GREEN, J.: Vitamin E and the biological antioxidant theory. Ann. N.Y. Acad. Sci. 203, 29-44 (1972).

GREEN, J., J. BUNYAN, M. CAWTHORNE and A. DIPLOCK: Vit. E and hepatotoxic agents. 1. Carbon tetrachloride and lipid peroxidation in the rat. Brit. J. Nutr. 23, 297-307 (1969).

GUILD, W.R., J.V. YOUNG and J.P. MERRILL: Anuria due to carbon tetrachloride intoxication. Ann. Int. Med. 48, 1221-1227 (1958).

HALL, M.C.: Carbon tetrachloride as an anthelmintic. Am. J. Trop. Med. 2, 373-379 (1922).

HALL, M.C. and J.E. SCHILLINGER: Miscellaneous tests of carbon tetr. as an anthelmintic. J. Agr. Res. 23, 163-192 (1923).

HARTMAN, A.D., N.R. Di LUZIO and M.L. TRUMBULL: Modification of chronic carbon tetrachloride hepatic injury by N, N'-diphenyl-p-phenylenediamine. Exp. Mol. Pathol. 9, 349-362 (1968).

HENI, N.: Abnahme des Cytochroms P-450 nach Inkubation mit CCl_4 in einem NADPH-regenerierenden System und teilweise Umwandlung in Cytochrom P-420. Experientia 27, 777-778 (1971).

HENI, N., H. REMMER: Die Wirkung von Tetrachlorkohlenstoff auf endoplasmatische Enzyme der Rattenleber. Arch. Toxikol. 28, 1-11 (1971).

HOCHSTEIN, P. und L. ERNSTER: ADP-activated lipid peroxidation coupled to the TPNH oxidase system of microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 338-394 (1963).

HOEKSTRA, W.G.: Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E. Fed. Proc. 34, 2083-2089 (1975).

HOTCHKISS, R.D.: A microchemical reaction resulting in the staining of polysacharide structure in fixed tissue preparations. Arch. Biochem. Biophys. 16, 131-141 (1948).

HOVE, E.: Interrelation between α-tocopherol and protein metabolism. III. The protective effect of vitamin E and certain nitrogenous compounds against CCl_4 poisoning in rats. Arch. Biochem. Biophys. 17, 467-473 (1948).

HOVE, E.: The toxicity of tri-o-cresyl phosphate for rats as related to dietary casein level, vitamin E and vitamin A. J. Nutr. 51, 609-622 (1953).

HRYCAY, E.G., P. O'BRIEN: Cytochrome P-450 as a microsomal peroxidase utilizing a lipid peroxide substrate. Arch. Biochem. Biophys. 147, 14-27 (1971).

JUCHAU, M.R., J.A. BOND and E.P. BENDITT: Aryl 4-monooxygenase and cytochrome P-450 in the aorta: Possible role in atherosclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 3723-3725 (1976).

JUDAH, J.D. and K.R. REES: Biochem. Soc. Symp. 16, 94 (1959).

KAPPUS, H., H. KIECZKA, M. SCHEULEN and H. REMMER: Molecular aspects of catechol and pyrogallol inhibition of liver microsomal lipid peroxidation stimulated by ferrous ion-ADP-complexes or by carbon tetrachloride. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 300, 179-187 (1977).

KELLER, F., A. SNYDER, F. PETRACEK and K. SANCIER: Hepatic free radical levels in ethanol-treated and carbon tetrachloride-treated rats. Biochem. Pharmacol. 20, 2507-2511 (1971).

KLAASEN, C.D., G.L. PLAA: Comparison of the biochemical alterations elicited in livers from rats treated with carbon tetrachloride, chloroform, 1, 1, 2-trichloroethane and 1, 1, 1-trichloroethane. Biochem. Pharmacol. 18, 2019-2027 (1969).

KLINGER, W., A. NEUGEBAUER, F.K. SPLINTER: Veränderungen der Biotransformation von Phenazon, Aminophenazon und Kodein als Zeichen der Frühschädigung der Rattenleber nach Tetrachlorkohlenstoffapplikation. Arch. Toxikol. 23, 178-185 (1968).

KÖSTER, U., D. ALBRECHT and H. KAPPUS: Evidence for carbon tetrachloride- and ethanol-induced lipid peroxidation in vivo demonstrated by ethane production in mice and rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 41, 639-648 (1977).

KÜSTER, D.: Persönliche Mitteilung (1978).

LEDUC, E.H. and J.W. WILSON: Injury to liver cells in carbon tetrachloride poisoning. Arch. Pathol. 65, 147-157 (1958).

LEWIS, S.E., E.D. WILLS: The destruction of -SH groups of proteins and amino acids by peroxides of unsaturated fatty acids. Biochem. Pharmacol. 11, 901-913 (1962).

LILLIE, R.D.: Histopathologic technic and practical histochemistry. The Blakiston Company, New York, Toronto (1954).

LITTERST, C.L., E.G. MIMNAUGH, R.L. REAGAN, T.G. GRAM: Comparison of in vitro drug metabolism by lung, liver and kidney of several common laboratory species. Drug Metab. Disp. 3, 259-265 (1975).

LITTERST, C.L., T.M. FARBER and E.J. van LOON: Potentiation of CCl_4-induced hepatotoxicity in the dog by chronic exposure to phenobarbital. Toxicol. Appl. Pharmacol. 25, 354-361 (1973).

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR und R.J. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).

MALING, H.M., B. SRIPP, I.G. SIPES, B. HIGHMAN, W. SAUL and M.A. WILLIAMS: Enhanced hepatotoxicity of carbon tetrachloride, thioacetamide, and dimethylnitrosamine by pretreatment of rats with ethanol and some comparisons with potentation by isopropanol. Toxicol. Appl. Pharmacol. 33, 291-308 (1975).

MAY, H.E., P.B. McCAY: Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids. I. Nature of the lipid alterations. J. Biol. Chem. 243, 2288-2295 (1968a).

MAY, H.E., P.B. McCAY: Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids. II. Enzymic properties and stoichiometry. J. Biol. Chem. 243, 2296-2305 (1968b).

MAYER, P.: Einfache Methode zum Aufkleben mikroskopischer Schnitte. Mitt. Zool. Stat. Neapel 2, 521-522 (1883).

McCOLLISTER, D.D., W.H. BEAMER, G.J. ATCHINSON and H.C. SPENCER: Fed. Proc. 9, 300 (1950).

McCOLLISTER, D.D., W.H. BEAMER, G.J. ATCHINSON and H.C. SPENCER: The absorption, distribution and elimination of radioactive carbon tetrachloride by monkeys upon exposure to low vapor concentrations. J. Pharmacol. Exp. Ther. 102, 112-121 (1951).

McLEAN, A.E.M.: Effect of hexane and carbon tetrachloride on microsomal cytochrome (P-450). Biochem. Pharmacol. 16, 2030-2036 (1967a).

McLEAN, A.E.M.: The effect of diet and vitamin E on liver injury due to carbon tetrachloride. Br. J. Exp. Pathol. 48, 632-636 (1967b).

McLEAN, A.E.M. and E.K. McLEAN: The effect of diet and 1, 1, 1-trichloro- 2, 2- bis - (p-chlorophenyl) ethane (DDT) on microsomal hydroxylating enzymes and on sensitivity of rats to carbon tetrachloride poisoning. Biochem. J. 100, 564-571 (1966).

MASSON, P.: Diagnostics histologiques. Malvine, Paris (1923).

McMANUS, J.F.A.: The demonstration of certain fatty substances in paraffin sections. J. Pathol. Bact. 58, 93-102 (1946).

McMANUS, J.F.A.: Histological and histochemical uses of periodic acid. Stain Techn. 23, 99-108 (1948).

MEFFERT, H., W. DIEZEL and N. SÖNNICHSEN: Stable lipid peroxidation products in human skin: Detection, ultraviolet light-induced increase, pathogenic importance. Experientia 32, 1397-1398 (1976).

MICHELSON, A.M. and P. DUROSAY: Hemolysis of human erythrocytes by activated oxygen species. Photochem. Photobiol. 25, 55-63 (1977).

MÖLBERT, E.: Das elektronenmikroskopische Bild der Leberparenchymzelle nach histotoxischer Hypoxidose. Beitr. Pathol. Anat. Allg. Pathol. 118, 203-227 (1957).

MOORE, L., G.R. DAVENPORT and E.J. LANDON: Calcium uptake of a rat liver microsomal subcellular fraction in response to in vivo administration of carbon tetrachloride. J. Biol. Chem. 251, 1197-1201 (1976).

MUKAI, F.H. and B.D. GOLDSTEIN: Mutagenicity of malondialdehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. Science 191, 868-869 (1976).

MUNKRES, K.D. and M. MINSSEN: Ageing of neurospora crassa. I. Evidence for the free radical theory of ageing from studies of a natural-death mutant. Mechanisms of Ageing and Development 5, 79-98 (1976).

MUNKRES, K.D. and H.J. COLVIN: Ageing of neurospora crassa. II. Organic hydroperoxide toxicity and the protective role of antioxidant and the antioxigenic enzymes. Mechanisms of Ageing and Development 5, 99-107 (1976).

NASH, T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch Reaction. Biochem. J. 55, 416-421 (1953).

NELSON, D.H. and A. RUHMANN-WENNHOLD: Corticosteroids increase superoxide anion production by rat liver microsomes. J. Clin. Invest. 56, 1062-1065 (1975).

NEUBERT, P. und D. MAIBAUER: Vergleichende Untersuchungen der oxidativen Wirkungen von Mitochondrien und Mikrosomen bei experimenteller Leberschädigung. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 235, 291-300 (1959).

NEW, P.S., G.D. LUBASH, L. SCHERR and A.L. RUBIN: Acute renel failure associated with carbon tetrachloride intoxication. J. Am. Med. Ass. 181, 903-906 (1962).

NIEBES, P. and G. PONARD: Stabilization of rat-liver lysosomes by (+)-cyanidanol-3 in vivo. Biochem. Pharmacol. 24, 905-909 (1975).

OBERLING, Ch. and Ch. ROUILLER: les effets de l'intoxication aigue au tétrachlorure de carbone sur le foie du rat; etude au microscope electronique. Ann. Anat. Pathol. 1, 401-427 (1956).

O'BRIEN, P.J. and A. RAHIMTULA: Involvement of cytochrome P-450 in the intracellular formation of lipid peroxides. J. Agr. Food Chem. 23, 154-158 (1975).

OETTINGEN, W.F. von: Arch. Int. Pharmacodyn. 81, 17 (1950).

OETTINGEN, W.F. von: The halogenated hydrocarbons of industrial and toxicological importance. Elsevier, Amsterdam (1964).

OETTINGEN, W.F. von, C.C. POWELL, N.E. SHARPLESS, W.C. ALFORD and L.J. PECORA: Nat. Inst. Hlth. Bull. 191 (1949).

OMURA, T. and R. SATO: Fractional solubilization of hemoproteins and partial purification of carbon monoxide-binding cytochrome from liver microsomes. Biochim. Biophys. Acta 71, 224-226 (1963).

OMURA, T. and R. SATO: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. J. Biol. Chem. 239, 2370-2374 (1964).

OMURA, T. and S. TAKASUE: A new method for simultaneous purification of cytochrome b_5 and NADPH-cytochrome c reductase from rat liver microsomes. J. Biochem. 67, 249-257 (1970).

ORRENIUS, S., G. DALLNER and L. ERNSTER: Inhibition of the TPNH-linked lipid peroxidation of liver microsomes by drugs undergoing oxidative demethylation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 329-334 (1964).

ORRENIUS, S., L. ERNSTER: Phenobarbital-induced synthesis of the oxidative demethylating enzymes of rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 60-65 (1964).

PAUL, B.B. and D. RUBINSTEIN: Metabolism of carbon tetrachloride and chloroform by the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 141, 141-148 (1963).

PEDERSON, T.C. and S.D. AUST: NADPH-dependent lipid peroxidation by purified NADPH-cytochrome c reductase from rat liver microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 789-795 (1972).

PEDERSON, T.C. and S.D. AUST: The mechanism of liver microsomal lipid peroxidation. Biochim. Biophys. Acta 385, 232-241 (1975).

PEDERSON, T.C., J.A. BUEGE and S.D. AUST: Microsomal electron transport. The role of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase in liver microsomal lipid peroxidation. J. Biol. Chem. 248, 7134-7141 (1973).

PIETRONIGRO, D.D., M.L. SELIGMAN, W.B.G. JONES and H.B. DEMOPOULOS: Retarding effects of DNA on the autoxidation of liposomal suspensions. Lipids 11, 808-813 (1976).

PLAA, G.L.: Mechanisms of potentation of CCl_4-induced hepatotoxicity. Fifth Int. Congr. Pharmacol., San Francisco, Abstracts S. 200-201 (1972).

PLAA, G.L. and H. WITSCHI: Chemicals, drugs and lipid peroxidation. Annual Rev. Pharmacol. Toxicol. 16, 125-141 (1976).

POPOV, Ch.S., L. YANTCHEV, G. GEORGIEV and L. GENEVA: Effect of different factors modifying the activity of some enzyme systems of the endoplasmic reticulum on the sensitivity of cell organelles against the damaging action of chemical agents. I. Interrelations between the activity of some enzyme systems located in endoplasmic reticulum and hepatotoxicity of carbon tetrachloride. Br. J. Exp. Pathol. 57, 593-603 (1976).

PRYOR, W.A.: Free radical reactions and their importance in biochemical systems. Fed. Proc. 32, 1862-1870 (1973).

PRYOR, W.A., J.P. STANLEY and E. BLAIR: Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. Lipids 11, 370-379 (1976).

RACHMILEWITZ, E.A., B.H. LUBIN and S.B. SHOHET: Lipid membrane peroxidation in β-Thalassemia major. Blood 47, 495-505 (1976).

RAO, K.S. and R.O. RECKNAGEL: Early onset of lipid-peroxidation in rat liver after carbon tetrachloride administration. Exp. Mol. Pathol. 9, 271-278 (1968).

RAO, K.S., R.O. RECKNAGEL: Early incorporation of carbon-labeled carbon tetrachloride into rat liver particulate lipids and proteins. Exp. Mol. Pathol. 10, 210-228 (1969).

RAO, K.S., E. GLENDE and R.O. RECKNAGEL: Effect of drug pretreatment on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in rat liver microsomal lipids. Exp. Mol. Pathol. 12, 324-331 (1970).

RECKNAGEL, R.O.: Carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pharmacol. Rev. 19, 145-208 (1967).

RECKNAGEL, R.O., A.K. GHOSHAL: Acceleration of lipid peroxidation by carbon tetrachloride. Fed. Proc. 24, 299-307 (1965).

RECKNAGEL, R.O. and A.K. GHOSHAL: New data on the question of lipoperoxidation in carbon tetrachloride poisoning. Exp. Mol. Pathol. 5, 108-117 (1966).

RECKNAGEL, R.O., A.K. GHOSHAL: Lipoperoxidation of rat liver microsomal lipids induced by carbon tetrachloride. Nature (London) 210, 1162-1163 (1966a).

RECKNAGEL, R.O., A.K. GHOSHAL: Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity. Lab. Invest. 15, 132-146 (1966b).

RECKNAGEL, R.O., E.A. GLENDE Jr., J. UGAZIO, R.R. KOCH and S. SRINIVOSA: New data in support of the lipid-peroxidation theory for carbon tetrachloride liver injury. Israel J. Med. Sci. 10, 301-311 (1974).

RECKNAGEL, R.O., E.A. GLENDE: Carbon tetrachloride hepatotoxicity, an example of lethal cleavage. CRC Crit. Rev. Toxicol. 2, 263-297 (1973).

REINER, O., S. ATHANASSOPOULOS, K.H. HELLMER, R.E. MURRAY und H. UEHLEKE: Bildung von Chloroform aus Tetrachlorkohlenstoff in Lebermikrosomen, Lipidperoxidation und Zerstörung von Cytochrom P-450. Arch. Toxikol. 29, 219-233 (1972).

REMMER, H., J. SCHENKMAN and R.W. ESTABROOK: Drug intercation with hepatic microsomal cytochrome. Mol. Pharmacol. 2, 187-190 (1966).

REMMER, H., H. GREIM, J.B. SCHENKMAN und R.W. ESTABROOK: Methods for the elevation of hepatic microsomal mixed function oxidase levels and cytochrome P-450. Methods in Enzymology 10, 703-708 (1967).

REMMER, H., D. ALBRECHT and H. KAPPUS: Lipid peroxidation in isolated hepatocytes from rats ingesting ethanol chronically. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 298, 107-113 (1977).

REYNOLDS, E.S.: Liver parenchymal cell injury. I. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride. J.Cell Biol. 19, 139-146 (1963).

RICHTER, G.: Veränderung der subzellulären Verteilung der Ribonucleinsäure in der Mäuseleber nach Tetrachlorkohlenstoffvergiftung. Biochim. Biophys. Acta 61, 144-146 (1962).

RICHTER, C., A. AZZI, A. WENDEL and U. WESER: Effect of the selenium antagonist tri-ortho-cresyl-phosphate on the lipid peroxide metabolism of the mouse in vivo and in vitro. Chem. Scripta 8A, 114-123 (1975).

RICHTER, C., A. WENDEL and U. WESER: Inhibition by superoxide dismutase of linoleic acid peroxidation induced by lipoxidase. FEBS Letters 51, 300-303 (1975).

ROBAK, J. and B. SOBANSKA: Relationship between lipid peroxidation and prostaglandin generation in rabbit tissues. Biochem. Pharmacol. 25, 2233-2236 (1976).

ROBBINS, B.H.: The absorption, distribution and excretion of carbon tetrachloride in dogs under various conditions. J. Pharmacol. Exp. Ther. 37, 203-212 (1929).

RODERS, M.K., E.A. GLENDE Jr. and R.O. RECKNAGEL: NADPH-dependent microsomal lipid peroxidation and the problem of pathological action at a distance. New data on induction of red cell damage. Biochem. Pharmacol. 27, 437-443 (1978).

ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. E. Oldenbourg, München (1968).

RUBINSTEIN, D. and L. KANICS: The conversion of carbon tetrachloride and chloroform to carbondioxide by rat liver homogenates. Canad.J.Biochem. 42, 1577-1583 (1964).

RUNGE, F.F.: Neueste phytochemische Entdeckungen zur Begründung einer wissenschaftlichen Phytochemie. Berlin (1821).

SANCIER, K.M.: Reply to: "Electron spin resonance study of homolytic cleavage of carbon tetrachloride in rat liver: Trichloromethyl free radicals". Pharmacol. Res. Commun. 8, 429-430 (1976).

SCHACTER, B.A., H.S. MARVER and U.A. MEYER: Hemoprotein catabolism during stimulation of microsomal lipid peroxidation. Biochim. Biophys. Acta 279, 221-227 (1972).

SCHENKMAN, J., H. REMMER and R. ESTABROOK: Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. Mol. Pharmacol. 3, 113-123 (1967).

SCHNEIDER, A.K., E.E. SMITH, F.E. HUNTER: Correlation of oxygen consumption with swelling and lipid peroxide function when mitochondria are treated with the swelling-inducing agents Fe^{2+}, glutathione, ascorbate, or phosphate. Biochemistry 3, 1470-1477 (1964).

SEAWRIGHT, A.A., A.E.M. McLEAN: The effect of diet on carbon tetrachloride metabolism. Biochem. J. 105, 1055-1060 (1967).

SASAME, H.A., J.A. CASTRO, J.R. GILETTE: Studies on the destruction of liver microsomal cytochrome P-450 by carbon tetrachloride administration. Biochem. Pharmacol. 17, 1769-1778 (1968).

SEYFRIED, H., H. BRUNNER and G. GRABNER: (+)-cyanidanol-3 treatment in acute viral hepatitis. In: New trends in the therapy of liver diseases. Int. Symp., Tirrenia, S. Karger, Basel, 177-181 (1975).

SLATER, T.F.: Early changes in rat-liver microsomal components produced by carbon tetrachloride and promethazine. Biochem. J. 97, 22-31 (1965).

SLATER, T.F.: Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat: A speculative mechanism based on activation. Nature (London) 209, 36-40 (1966).

SLATER, T.F.: In vitro effects of carbon tetrachloride on rat-liver microsomes. Biochem. J. 101, 16-25 (1966).

SLATER, T.F.: The inhibitory effects in vitro of phenothiazines and other drugs on lipid-peroxidation systems in rat liver microsomes and their relationship to the liver necrosis produced by carbon tetrachloride. Biochem. J. 106, 155-160 (1968).

SLATER, T.F.: In: Lysosomes in biology and pathology volume 1, Elsevier (North-Holland, Amsterdam), 469-475 (1969).

SLATER, T.F.: Free radical mechanisms in tissue injury. Pion, London (1972).

SLATER, T.F.: The role of lipid peroxidation in liver injury. In: Pathogenesis and mechanisms of liver cell necrosis, MTP-Press Ltd. S. 209-223 (1975).

SLATER, T.F., M.N. EAKINS: Interactions of (+)-cyanidanol-3 with free radical generating systems. In: New trends in the therapy of liver diseases. Int. Symp., Tirrenia S. Karger, Basel S. 84-89 (1975).

SLATER, T.F., B.C. SAWYER: The effects of carbon tetrachloride on rat liver microsomes during the first hour of poisoning in vivo, and the modifying actions of promethazine. Biochem. J. 111, 317-325 (1969).

SLATER, T.F. and B.C. SAWYER: The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. General features of the systems used. Biochem. J. 123, 805-814 (1971a).

SLATER, T.F. and B.C. SAWYER: The stimulatory effects of carbon tetrachloride on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. Interaction sites in the ER. Biochem. J. 123, 815-821 (1971).

SLATER, T.F. and B.C. SAWYER: The stimulatory effects of carbon tetrachloride on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. Inhibitory effects of free-radical scavengers and other agents. Biochem. J. 123, 823-828 (1971).

SMUCKLER, E.A.: Polysome changes in acute toxic liver injury requires the intact cell. Fed. Proc. 24, 556-568 (1965).

SMUCKLER, E.A.: Structural and functional alteration of the endoplasmic reticulum in liver. In: Structure and function of the endoplasmic reticulum in animal cells. Universitätsforlaget, Oslo u. Academic Press, London & New York, 13-56 (1968).

SMUCKLER, E.A., E. ARRHENIUS und T. HULTIN: Alterations in microsomal electron transport, oxidative N-demethylation and azo-dye cleavage in carbon tetrachloride and dimethylnitrosamine-induced liver injury. Biochem. J. 103, 55-64 (1967).

SMUCKLER, E.A., O.A. ISERI, E.P. BENDITT: Studies on carbon tetrachloride intoxication: The effect of carbon tetrachloride on incorporation of labelled amino acids into plasma proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 5, 270-275 (1961).

SMUCKLER, E.A., O.A. ISERI and E.P. BENDITT: An intracellular defect in protein synthesis induced by carbon tetrachloride. J. Exp. Med. 116, 55-72 (1962).

STENGER, R.J.: Hepatic parenchym. Cell alterations after longterm carbon tetrachloride administration. Am. J. Path. 43, 867-876 (1963).

STOWELL, R.E. and C.S. LEE: Histochemical studies of mouse liver after feeding of carbon tetrachloride. Arch. Pathol. 50, 519-537 (1950).

TORRIELLI, M.V. and T.F. SLATER: Inhibition of NADPH-cytochrome c reductase by propyl gallate. Biochem. Pharmacol. 20, 2027-2032 (1971).

TORRIELLI, M.V. and G. UGAZIO: Biochemical aspects of the protective action of propyl gallate on liver injury in rats poisoned with carbon tetrachloride. Toxicology 34, 151-169 (1975).

TRAIGER, G.J. and J.V. BRUCKNER: The partizipation of 2-butanone in 2-butanol-induced potentation of carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pharmacol. Exp. Ther. 196, 493-500 (1976).

TSYRLOV, I., V. MISHIN and V. LYAKHOVICH: Resistance of microsomes from CCl_4-cirrhotic rat liver to lipoperoxidation activity. Life Sci. 11, Part II, 1045-1054 (1972).

UEHLEKE, H.: Stimulierung einiger mikrosomaler Fremdstoffoxidationen durch Phenobarbital, Methylcholanthen und Chlorphenothan, einzeln und in Kombination. Arch. Pharmacol. Exp. Pathol. 259, 66-78 (1967).

UEHLEKE, H., K.H. HELLMER and S. TABARELLI: Binding of ^{14}C-carbon tetrachloride to microsomal proteins in vitro and formation of $CHCl_3$ by reduced liver microsomes. Xenobiotica 3, 1-11 (1973).

UGAZIO, G., R.R. KOCH and R.O. RECKNAGEL: Mechanism of protection against carbon tetrachloride by prior carbon tetrachloride administration. Exp. Mol. Pathol. 16, 281-285 (1972).

UGAZIO, G., R.R. KOCH and R.O. RECKNAGEL: Reversibility of liver damage in rats rendered resistant to carbon tetrachloride by prior carbon tetrachloride administration: Bearing on the lipoperoxidation hypothesis. Exp. Mol. Pathol. 18, 281-289 (1973).

UGAZIO, G., M.V. TORRIELLI, E. BURDINO, B.C. SAWYER and T.F. SLATER: Long-range effects of products of carbon tetrachloride-stimulated lipid peroxidation. Biochem. Soc. Transact. 4, 353-356 (1976).

WEDDLE, Ch.C., K.R. HORNBROOK and P.B. McCAY: Lipid peroxidation and alteration of membrane lipids in isolated hepatocytes exposed to carbon tetrachloride. J. Biol. Chem. 251, 4973-4978 (1976).

WILLS, E.D.: Lipid peroxide formation in microsomes: Relationship of hydroxylation to lipid peroxid formation. Biochem. J. 113, 333-341 (1969).

WILLS, E.D.: Lipid peroxide formation in microsomes. The role of non-hem iron. Biochem. J. 113, 325-332 (1969).

WILLS, E.D.: Effects of lipid peroxidation on membrane-bound enzymes of the endoplasmic reticulum. Biochem. J. 123, 983-991 (1971).

WILLS, E.D.: Effects of iron overload on lipid peroxide formation and oxidative demethylation by the liver endoplasmic reticulum. Biochem. Pharmacol. 21, 239-247 (1972).

WILLIS, R.J. and R.O. RECKNAGEL: NADPH-dependent lipid peroxidation in lung microsomes. Fed. Proc. 36, 3656-3662 (1977).

WILSON, R.B., N.S. KULA, P.M. NEWBERNE and M.W. CONNER: Vascular damage and lipid peroxidation in choline-deficient rats. Exp. Mol. Pathol. 18, 357-368 (1973).

WIRTSCHAFTER, Z.T. and M.W. CRONYN: Free radical mechanism for solvent toxicity. Arch. Environ. Health 9, 186-192 (1964).

ZYMA (Hrsg. Firma Zyma): Essais de tolérance de la (+)-catéchine. Internal report, Zyma, Nyon (1970).

ZYMA (Hrsg. Firma Zyma): Toxicity Z 7000. Internal report, Zyma, Nyon (1972).

ZYMA (Hrsg. Firma Zyma): Catergen^{R}, ein neues Heilmittel. Zyma, Nyon (1976).

Lebenslauf

Am 5.1.1952 wurde ich, Josef Zentner, als Sohn der Eheleute Josef und Gertrud Zentner, geb. Maichel, in Uttenweiler, Kreis Biberach, geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Uttenweiler wechselte ich 1964 an das Gymnasium in Riedlingen über, wo ich 1972 die Reifeprüfung ablegte.

Im Winter-Semester 1972/73 nahm ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen das Studium der Medizin auf und legte 1974 die ärztliche Vorprüfung, 1975 den ersten, 1977 den zweiten und - im Anschluß an das praktische Jahr, das ich an den städtischen Krankenhäusern in Stuttgart-Bad Cannstatt absolvierte - am 16. Oktober 1978 den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab.

Seit November 1978 bin ich als wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen tätig.